

Aus der Medizinischen Klinik I für Onkologie,
Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie
des Universitätsklinikums des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. M. Pfreundschuh

**Generierung und Charakterisierung MHC-Peptid-
spezifischer Antikörper, die ein von MHC-I präsenti-
ertes Peptid des Cancer Testis Antigens SSX2 er-
kennen - Untersuchungen zur SSX2-
Antigenpräsentation auf Tumorzelllinien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Christine Sturm

Homburg, 2009

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh

Meiner Familie gewidmet

3.3.5. Antikörper als in-vivo-Diagnostika und Therapeutika	25
4. MHC-Moleküle und Antigenpräsentation	26
4.1. HLA Klasse I-Moleküle	27
4.1.1. Struktur der HLA Klasse I-Moleküle	27
4.1.2. Funktion der HLA Klasse I-Moleküle	28
4.2. HLA Klasse II-Moleküle	29
4.2.1. Struktur der HLA Klasse II-Moleküle	29
4.2.2. Funktion der HLA Klasse II-Moleküle	29
4.3. Kreuzpräsentation (Ackerman et al., 2004; Heath et al., 2004)	30
5. Generierung MHC-Peptid-spezifischer Reagenzien	31
6. Heterologe Expression von Antikörperfragmenten in E. coli	32
6.1. Bakterielle Expression löslicher Antikörperfragmente	32
6.2. Phage-Display	33
7. Immuntherapeutischer Ansatz zur Behandlung maligner Erkrankungen	35
7.1. Tumorantigene	35
7.2. Tumorescape-Mechanismen	37
7.3. Die SSX-Familie und das CTA HOM-MEL-40/SSX2	38
8. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	40
MATERIAL UND METHODEN	42
1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	42
2. Peptide, Antikörper und Färbereagenzien	47
3. Geräte und Software	50
4. Puffer und Lösungen	51
5. Zellkultur	55
5.1. Kulturbedingungen	55
5.2. Ablösen adhärenter Zellen	55
5.3. Einfrieren vitaler Zellen	55
5.4. Auftauen vital eingefrorener Zellen	56
5.5. Charakterisierung der verwendeten Zelllinien	56
5.6. Vitalitätstest: Farbausschluss mittels Trypanblau	57

6.	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	58
7.	Die Phage-Display-Technologie (Hoogenboom et al., 2000).....	59
7.1.	<i>Phagemidbank</i>	59
7.2.	<i>Selektion von Phagen-Antikörpern auf biotinylierte MHC-Komplexe</i>	59
7.2.1.	MHC-Peptid-Komplexe	59
7.2.2.	Prinzip der Selektionen	59
7.2.3.	Bestimmung des Phagentiters und Phagenamplifikation	62
7.2.3.1.	Bestimmung des Phagentiters (Input und Output)	63
7.2.3.2.	Phagenamplifikation	64
7.2.4.	Produktion von Phagen in einer 96-Well-Microtiter-Platte.....	65
7.2.5.	ELISA zur Detektion von Phagen-Antikörper-Fragmenten (Henderikx et al., 1998).....	67
7.2.6.	PCR-Amplifikation und Fingerprint der positiven Klone	68
7.2.6.1.	Polymerase-Ketten-Reaktion (Saiki et al., 1988)	68
7.2.6.2.	Fingerprint der amplifizierten DNA	70
7.2.7.	Expression und Reinigung löslicher Fab-Antikörper (McCafferty et al., 1990).....	70
7.2.7.1.	Expression der löslichen Fab-Antikörper.....	70
7.2.7.2.	Reinigung löslicher Fab-Antikörper	72
7.2.7.3.	Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE	73
7.2.7.4.	Coomassie-Färbung.....	74
7.2.7.5.	Westernblot	74
7.2.8.	ELISA zur Detektion von aufgereinigten Fab-Antikörpern.....	76
8.	Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion in den Vektor pCES1	76
8.1.	<i>Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl₂-Methode) (Kushner, 1978)</i>	78
8.2.	<i>Transformation (Lederberg et al., 1974)</i>	78
8.3.	<i>Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	79
8.3.1.	TENS-Methode	79
8.3.2.	Isolation von DNA aus Agarosegelen (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare).....	79

8.3.3. Sequenzierung von DNA-Fragmenten	79
8.3.4. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Sambrook, 1989)	80
8.3.5. Ligation von DNA-Fragmenten (Sgaramella et al., 1970)	80
9. Oberflächenfärbung von Zellen und Durchflusszytometrie	81
9.1. Durchflusszytometrie.....	81
9.2. Oberflächenfärbung von Zellen	82
9.2.1. Färbung Peptid gepulster Zellen (T2-, LCL-, MCF7-Zellen).....	82
9.2.2. Färbung von Karzinomzelllinien	83
9.2.3. Blockierungsversuche auf Karzinomzelllinien	83
10. IFN γ -ELISPOT Assay	84
10.1. Prinzip	84
10.2. Durchführung	84
10.3. Inhibition der IFN γ Ausschüttung mittels MHC-Peptid-spezifischer Fabs auf Tumorzellen	85
10.4. Inhibition der IFN γ -Ausschüttung mittels MHC-Peptid-spezifischer Fabs auf Streptavidin-gekoppelten Beads	86
11. Kinetikanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz	87
11.1. Prinzip	87
11.2. Durchführung	88
12. Fluoreszenzmikroskopie	90
12.1. Membranfärbungen von Tumorzellen	90
12.2. Intrazelluläre Färbungen verschiedener Tumorzelllinien	92
13. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	93
13.1. Prinzip (Belyavsky et al., 1989)	93
13.2. RNA-Extraktion aus Zellkulturen mittels RNeasy [®] Mini Kit.....	93
13.3. Herstellung von cDNA aus mRNA.....	95
13.4. PCR	96
ERGEBNISSE	98
1. Zusammenfassung der Selektionsergebnisse	98
2. Bestimmung der Spezifität der selektionierten Klone	103

2.1.	<i>Produktion von Fab-Antikörpern</i>	103
2.2.	<i>Überprüfung der MHC-Peptid-Spezifität mittels ELISA</i>	104
2.3.	<i>Überprüfung der spezifischen Reaktivität gegen exogen mit Peptid beladene Zellen</i>	106
2.3.1.	Ergebnisse der gegen den SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-Komplex selektionierten Fab-Antikörper	106
2.3.1.1.	Reaktivität gegenüber T2-Zellen	106
2.3.1.2.	Reaktivität auf EBV-immortalisierten B-Zellen (LCLs).....	110
a)	HLA-A*0201-positive EBV-immortalisierte B-Zellen.....	110
b)	HLA-A*0201-negative EBV-immortalisierte B-Zellen	112
2.3.2.	Ergebnisse der gegen den SSX2 ₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex selektionierten Fab-Antikörper	114
2.3.2.1.	Reaktivität gegenüber T2-Zellen	114
2.3.2.2.	Reaktivität auf EBV-immortalisierten B-Zellen (LCLs).....	116
a)	HLA-A*0201-positive EBV-immortalisierte B-Zellen.....	116
b)	HLA-A*0201-negative EBV-immortalisierte B-Zellen	117
2.4.	<i>CTL-Inhibition mittels IFNγ-ELISPOT</i>	117
2.4.1.	Ergebnisse der gegen den SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-Komplex selektionierten T-Zellen.....	118
2.4.1.1.	CTL-Inhibition auf exogen beladenen MCF7-Zellen.....	118
2.4.1.2.	CTL-Inhibition auf SK-Mel-37-Zellen	119
2.4.2.	Ergebnisse der gegen den SSX2 ₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex selektionierten T-Zellen.....	120
2.4.2.1.	CTL-Inhibition auf exogen beladenen MCF7-Zellen.....	120
2.4.2.2.	CTL-Inhibition auf Me275-Zellen	121
3.	<i>Untersuchung des Phänomens der „in vitro-Binder“</i>	123
3.1.	<i>Inhibitionsversuch auf Streptavidin-Beads</i>	123
3.1.1.	Fab-Interaktion mit MHC-Peptid-gekoppelten Streptavidin-Beads.....	123
3.1.2.	CTL-Inhibition auf MHC-Peptid-gekoppelten Streptavidin-Beads	124
3.2.	<i>Bindungsmodi der Fab-Antikörper nach Mutagenisierung von SSX2₁₀₃₋₁₁₁</i>	125
3.2.1.	Bindungsverhalten der Fab-Antikörper nach Glutamatsubstitution	126

3.2.2.	Bindungsverhalten der Fab-Antikörper nach Alaninsubstitution des Peptids SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁	127
3.2.2.1.	Bindungsverhalten auf exogen mit Peptid beladenen T2- Zellen	127
3.2.2.2.	Bindungsverhalten auf rekombinanten biotinylierten MHC- Monomeren im ELISA	128
3.3.	<i>Bindungsmodi der Fab-Antikörper nach Mutagenisierung der HLA- A*0201-Schwerkette</i>	133
4.	Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion	137
5.	Sensitivitätsanalysen	142
5.1.	<i>Titration der Peptide SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉</i>	142
5.1.1.	Peptidtitration auf T2-Zellen	142
5.1.2.	Peptidtitration auf MCF7-Zellen	143
5.2.	<i>Experimentelle Bestimmung der Bindungsstärke der beiden Epitope SSX2₁₀₃₋₁₁₁ und SSX2₄₁₋₄₉ im HLA-A*0201-Kontext</i>	145
6.	Bindungskinetik der selektionierten Antikörper	148
7.	Detektion des MHC-Peptid-Komplexes nach endogener Prozessierung und Präsentation.....	153
7.1.	<i>Ausschluss einer Kreuzreaktivität gegen andere Mitglieder der SSX- Familie</i>	154
7.2.	<i>Durchflusszytometrische Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf nativen Tumorzellen</i>	155
7.3.	<i>Durchflusszytometrische Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf Tumorzellen nach Behandlung mit IFNγ</i>	158
7.4.	<i>Inhibitionsversuch auf den „Positivlinien“</i>	160
7.5.	<i>Fluoreszenzmikroskopische Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf nativen Tumorzellen</i>	161
7.5.1.	Untersuchung der SSX-Expression und Präsentation HLA- A*0201 restringierter Epitope.....	163
7.5.2.	Untersuchung der Expression SSX-kodierender RNA und des SSX-Proteins	170
7.5.3.	Simultane Detektion der Präsentation von SSX2 ₄₁₋₄₉ und SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ im Kontext von HLA-A*0201	173

7.5.4. Detektion der SSX-RNA-Expression und Präsentation beider MHC-Peptid-Komplexe nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxy- cytidin.....	176
--	-----

DISKUSSION179

1. MHC-Peptid-Spezifität der selektionierten Fab-Antikörper	179
2. Bindungsmodus der Fab-Antikörper gegen SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ / HLA- A*0201	180
3. Detektion des MHC-Peptid-Komplexes nach endogener Prozessierung	184
4. Variabilität der Expression der SSX-Gen-Familie	188
5. Erkenntnisse aus der Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin...	190
6. Perspektiven	193

APPENDIX195

1. Abbildungsverzeichnis:	195
2. Tabellenverzeichnis:	198
3. Literaturverzeichnis.....	199
4. Eigene Publikationen	220
5. Danksagung.....	221

Zusammenfassung

Das Cancer/Testis Antigen SSX2 (**S**ynovialsarkom, **X** Bruchpunkt 2), auch HOM-Mel-40 genannt, ist ein Mitglied der SSX-Gen-Familie, die aus 9 Genen besteht. Es wird in einer Vielzahl verschiedener menschlicher Tumoren exprimiert, wie zum Beispiel in Kopf- und Halstumoren, Ovarialkarzinomen, malignen Melanomen, Lymphomen, kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinomen und dem sehr seltenen Synovialsarkom. Bisher wurden zwei verschiedene HLA-A*0201-restringierte Epitope des SSX2-Proteins, SSX2₁₀₃₋₁₁₁ und SSX2₄₁₋₄₉, identifiziert, die beide in der Lage sind, eine SSX2-spezifische Antwort zytotoxischer T-Zellen (CTL) hervorzurufen. Da SSX2 gewöhnlich im Hoden und nur in sehr geringem Maß in der Schilddrüse exprimiert wird, stellt es ein interessantes Target für die Immuntherapie vieler Malignome dar.

Mit Hilfe der Phage-Display-Technologie entwickelten wir ein Panel von Fab-Fragmenten, die spezifisch SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉ im HLA-A*0201-Kontext, ähnlich einem T-Zell-Rezeptor, erkennen. Die meisten Fab-Antikörper erkannten nicht nur den rekombinanten löslichen MHC-Peptid-Komplex, sondern auch den nativen Komplex, wie er auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen vorkommt. Allerdings detektierten einige Fab-Antikörper, obwohl sie gegen den rekombinant gefalteten MHC-Peptid-Komplex im ELISA reagierten, weder den nativen MHC-Peptid-Komplex, noch inhibierten sie spezifische CTLs. Daher wurde die Art und Weise der Interaktion detaillierter untersucht. Durch das Einbringen einzelner Aminosäuremutationen in der HLA-A*0201 Schwerkette identifizierten wir ähnlich wie bei TCRs die Position K66 als kritischen Bindungspunkt. Analysen der Bindungskinetik mittels Oberflächenplasmonresonanz machten deutlich, dass nur solche Fab-Antikörper zur T-Zell-Inhibition fähig sind, die mit höherer Affinität als der T-Zell-Rezeptor mit dem MHC-Peptid-Komplex interagieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass Moleküle, die CTLs durch kompetitive Verdrängung blockieren, die gleiche Spezifität, jedoch eine höhere Affinität für den MHC-Peptid-Komplex besitzen müssen als der TCR.

Zur Untersuchung der Antigenprozessierung SSX2-exprimierender Tumorzellen visualisierten wir den SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201- und den SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex auf der Zelloberfläche verschiedener Melanomzelllinien. Wir wiesen die Präsentation beider Epitope im HLA-A*0201-Kontext für die Mehrzahl aller Sk-Mel-37 Zellen nach. Allerdings präsentierten alle Me275-Zellen SSX2₄₁₋₄₉, aber nur ein kleiner Teil (<1%) SSX2₁₀₃₋₁₁₁. Der partielle Verlust der Präsentation geht mit einer fehlenden Lyse durch spezifische T-Zellen einher. Unsere Ergebnisse geben einen Eindruck für die Komplexität der Antigenpräsentation von Tumoren. Ihr Immun-Escape stellt somit nicht notwendigerweise ein generelles Phänomen dar, sondern kann sich spezifisch nur auf einzelne Epitope beschränken.

Summary

The cancer/testis antigen SSX2 (**S**ynovial **S**arcoma, **X** breakpoint **2**), also named HOM-Mel-40, is a member of the SSX gene family, which consists of 9 genes. It is expressed in a variety of different human neoplasms such as head and neck cancer, ovarian cancer, malignant melanoma, lymphoma, colorectal cancer, breast cancer and the very seldom synovial sarcoma. Two different HLA-A*0201-restricted epitopes of the SSX2 protein have been identified, SSX2₁₀₃₋₁₁₁ and SSX2₄₁₋₄₉ respectively. Both are able to induce specific responses of cytotoxic T-cells (CTL). Because SSX2 is usually expressed in testis only and at very low levels in the thyroid it is an interesting target for immunotherapy of many malignancies.

Using phage-display technology a panel of Fab-fragments was generated that specifically recognize SSX2₁₀₃₋₁₁₁ or SSX2₄₁₋₄₉ in the context of HLA-A*0201 in the same manner as a T-cell-receptor (TCR) does. Most Fab-antibodies not only recognize the cognate MHC-peptide-complex in a recombinant soluble form but also the native complex as displayed on the surface of antigen-presenting cells. However some Fab-antibodies neither detected the native MHC-peptide-complex on cells nor blocked specific CTLs, while reacting against the recombinantly refolded MHC-peptide-complex in ELISA. Therefore the mode of binding was studied in detail. By introducing single amino acid mutations in the HLA-A*0201 heavy chain we identified the K66 residue as critical for binding similar to that of TCRs. Measurements of binding kinetics by surface plasmon resonance revealed that only those Fab-antibodies are able to specifically block CTLs, which interact with the MHC-peptide complex with higher affinity than the TCR does. These results indicate that molecules that block CTLs by competitive binding must have the same specificity but higher affinity for the MHC-peptide-complex than the TCR.

To examine antigen processing of SSX2-expressing tumour cells in detail we directly visualized SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 and SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 complexes on cell surface of different melanoma cell lines. Presentation of both epitopes in the context of HLA-A*0201 was demonstrated for the majority of SK-Mel-37 cells. However all Me275 cells displayed SSX2₄₁₋₄₉ but only a small fraction (<1%) of Me275 cells displayed SSX2₁₀₃₋₁₁₁. The partial lack of presentation of SSX2₁₀₃₋₁₁₁ comes along with the absence of lysis by specific T-cells. Our results give an impression for the complexity of antigen presentation of tumours. Their immun-escape doesn't necessarily mark a general phenomenon but can also be limited to some epitopes only.

Abkürzungsverzeichnis

A	ADCC	antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
	APC	antigenpräsentierende Zelle
	AS	Aminosäuren
B	BCR	B cell receptor
	b-pMHC	biotinylierter MHC-Peptid-Komplex
C	CD	Cluster of differentiation
	CDCC	complement dependent cell-mediated cytotoxicity
	CDR	complementary determining regions
	c-Met	mesenchymal epithelial transition factor
	CT7, CT9, CT10	cancer testis antigen 7, 9 bzw. 10
	CTA	cancer/testis antigene, CT-Antigene
	cTAGE-1	cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen 1
	CTLs	zytotoxische T-Lymphozyten
	CTLA-4	cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
	CTp11	cancer/testis-associated protein of 11 kDa
D	DAC	5-Aza-2'-deoxycytidin
	dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
	dsFv	Disulfidbrücken-stabilisierte Fv
E	EBV	Eppstein-Barr-Virus
	ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
	ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Technique
	ER	endoplasmatisches Retikulum
F	FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
	FCS	fetales Kälberserum
	FI	Fluoreszenzintensität
	FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
	FR	framework regions
G	GAGE	G antigen gene family
	G-Mean	geometric mean fluorescence intensity
	gp75, gp100	glycoprotein 75 bzw. 100
	GvHD	graft versus host reaction, Transplantat-Wirt-Reaktion

H	HBV	Hepatitis B
	HCC	hepatozelluläres Karzinom
	HCV	Hepatitis C
	HER-2/neu	human epidermal receptor 2 / neurological
	HPV	Humanes Papillomavirus
	HRP	Horseraddish-Peroxidase
I	IFN γ	Interferon γ
	Ig	Immunglobulin
	IL	Interleukin
L	LAGE	L antigen gene family
	LCL	Lymphoblastoid Cell Line
M	M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis
	MAGE	Melanoma antigen family
	MHC	major histocompatibility complex, Majorhistokompatibilitätskomplex
	M/PBS	Milchpulver gelöst in PBS
	MUC1	Mucin 1, CD227, PEM („polymorphic epithelial mucin“)
N	NK-Zellen	natürliche Killerzellen
	NY-ESO-1	New York-esophagus 1
P	PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
	PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
	PE	R-Phycoerythrin
	PEG	Polyethylenglykol
R	RT-PCR	reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
	RU2	renal ubiquitous 2 antigen
S	SAGE	sarcoma-associated antigen
	scFv	single-chain Fv-Fragment
	SCP1	synaptonemales Komplex-Protein 1
	SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
	SEREX	serological analysis of recombinant cDNA expression libraries

	SPR	surface plasmon resonance, Oberflächenplasmonresonanz
	SSX2	synovial sarcoma, X breakpoint 2
T	TAP	transporter associated with antigen processing
	TCR	T-cell-receptor
	TGF	transforming growth factor
	TGF- β	transforming growth factor β
	TNF- β	Tumor-Nekrose-Faktor- β
V	VEGF	Vascular endothelial growth factor

Einleitung

1. *Das Immunsystem*

Das Immunsystem der Vertebraten dient der Abwehr und Eliminierung körperfremder oder maligne transformierter körpereigener Stoffe. Es zeichnet sich durch vier Merkmale aus: Erstens das Gedächtnis, zweitens die Spezifität, drittens die Fremderkennung und viertens die Selbsttoleranz, welche eine Diskriminierung zwischen körpereigen und körperfremd voraussetzt (von Boehmer et al., 1990). Die biologische Abwehr lässt sich in eine externe Abwehr, die auf der Körperoberfläche stattfindet und beispielsweise durch den Säureschutzmantel der Haut, Speichel und Tränenflüssigkeit repräsentiert wird und eine interne Abwehr, welche innerhalb des Körpers aktiv ist, untergliedern. Weiterhin setzt sich das Immunsystem aus zwei Hauptkomponenten zusammen, der angeborenen (innaten), unspezifischen und der erworbenen (adaptiven), spezifischen Abwehr, die in einem fein abgestimmten, konzertierten Zusammenspiel die Verteidigung des Organismus gegen mikrobielle Krankheitserreger oder maligne transformierte Zellen gewährleisten.

Die innate Abwehr bildet die erste Verteidigungslinie des Organismus und umfasst mechanische, chemische und biologische Faktoren. Die angeborene Immunität hat die wichtige Aufgabe, eine Infektion während der ersten Tage, die bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort vergehen, in Schach zu halten. Die zelluläre Komponente der unspezifischen Abwehr besteht aus unterschiedlichen Zelltypen des hämatopoetischen Systems, wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Der nicht-zelluläre Anteil setzt sich aus löslichen Faktoren (Zytokinen) und Bestandteilen des Komplementsystems zusammen.

Das adaptive Immunsystem wird zur Eliminierung einer Infektion aktiviert, wenn die innate Abwehr nicht ausreichend ist. Diese Form der Abwehr zeichnet sich einerseits durch eine hohe Spezifität aus, welche auf der klonalen Selektion von Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren beruht und andererseits durch die Erinnerung an vorangegangene Kontakte mit dem gleichen Antigen. Das Auslösen einer spezifischen Immunantwort beginnt, wenn in einem infizierten Gewebe ein Pathogen von einer unreifen dendritischen Zelle, die als spezialisierter Phagozyt in den meisten Geweben dauerhaft vorkommt und relativ langlebig ist, aufgenommen wird. Nach der

Internalisierung wird die dendritische Zelle aktiviert und reift zu einer sehr effektiven antigenpräsentierenden Zelle (APC). Die Funktion der dendritischen Zelle besteht primär darin, Antigene von Pathogenen zu den peripheren lymphatischen Organen zu transportieren und dort pathogenspezifischen Lymphozyten zu präsentieren. Die Grundlage der spezifischen Abwehr wird zum einen von den T-Lymphozyten gebildet, die den zellulären Part repräsentieren, zum anderen von den B-Lymphozyten, welche an der humoralen Abwehr beteiligt sind. Effektorzellen der erworbenen zellulären Immunantwort sind T-Killer- (CTLs), T-Memory- und T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen), wobei der efferente Teil in der Zelllyse durch CTLs besteht. Effektorzellen der adaptiven humoralen Immunantwort sind Plasmazellen und B-Memoryzellen durch Antikörperproduktion und -sekretion. Hierbei wird der efferente Teil durch die Aktivität der Antikörper vermittelt, welche Antigene neutralisieren und die Phagozytose durch professionelle Phagozyten sowie die Zelllyse durch das Komplementsystem und NK-Zellen fördern.

2. Die Effektorzellen des zellvermittelten adaptiven Immunsystems

2.1. Funktion von T-Zellen

T- (Thymus) Lymphozyten reifen im Thymus und stellen das zelluläre Abwehrsystem des Körpers dar (von Boehmer et al., 1997). T-Zellen sind mit einem T-Zell-Rezeptor (TCR) (Lin et al., 1990) ausgestattet und auf die Erkennung von prozessierten und membrangebundenen Antigenen beschränkt (Davis et al., 1988). Hierbei erkennt der T-Zell-Rezeptor im Wesentlichen Antigene, die als kurze Peptide an sog. Majorhistokompatibilitätsmoleküle (MHC) auf der Oberfläche Antigen präsentierender Zellen gebunden vorliegen (MHC-Restriktion) (Zinkernagel et al., 1974).

Reife T-Zellen lassen sich in zwei Populationen untergliedern: CD4-positive ($CD4^+$) T-Zellen, die an ihrer Oberfläche das Korezeptormolekül CD4 exprimieren und CD8-positive ($CD8^+$) T-Zellen, welche auf der Oberfläche das Korezeptormolekül CD8 tragen. Die beiden Gruppen von T-Zellen unterscheiden sich auch in ihrer Funktion. $CD4^+$ T-Zellen, die auch T-Helferzellen genannt werden, sind an der Regulation und Stimulierung immunkompetenter Zellen beteiligt. Sie aktivieren durch Produktion und Sekretion hormonähnlicher Substanzen (Zytokine) Makrophagen und B-Zellen. Die $CD4^+$ T-Zellen lassen sich nach dem Expressionsmuster ihrer Zytokine in zwei Subpopulationen einteilen, die bei der Immunabwehr, insbesondere bei bakteriellen In-

fektionen, jeweils verschiedene Funktionen erfüllen (Constant et al., 1997; Mosmann et al., 1989). Eine Entwicklung naiver T_H -Zellen (T_H0 -Zellen) kann je nach dem in ihrer Umgebung vorherrschenden Zytokinmuster zu T_H1 - oder T_H2 -Zellen verlaufen. Die erste Untergruppe, sog. T_H1 -Zellen, ist für die Bekämpfung intrazellulärer Bakterieninfektionen von Bedeutung, z. B. Infektionen durch *M. tuberculosis*. T_H1 -Zellen (Syn: inflammatorische T-Zellen) sezernieren IL 2, TNF- β und IFN γ , die zu einer Aktivierung von Makrophagen führen und veranlassen die Fusion der Lysosomen mit den Vesikeln, welche die Bakterien enthalten. Mit der Makrophagenaktivierung wird eine Reaktion in Richtung Entzündung initiiert. T_H1 -Zellen entstehen aus naiven T-Zellen unter Einwirkung von Interleukin 12 stimulierter Makrophagen. Die zweite Subpopulation $CD4^+$ T-Zellen, T_H2 -Zellen, spielt bei der Vernichtung extrazellulärer Erreger eine wichtige Rolle, da sie B-Zellen aktivieren. Die Präsenz von T_H2 -Zellen ist daher so relevant, weil nur wenige Antigene mit besonderen Merkmalen in der Lage sind, ungeprägte (naive) B-Lymphozyten zu aktivieren. Bei den meisten Antigenen ist ein zusätzliches Signal von T_H -Zellen erforderlich, bevor es zu einer Stimulation von B-Zellen kommt, die dann proliferieren und zu Plasmazellen differenzieren, welche Antikörper freisetzen. T_H2 -Zellen entstehen aus T_H0 -Zellen unter Einwirkung von IL 4. Sie selbst bilden IL-4, -5, -6 und -10, einen Makrophageninhibitor (Ding et al., 1993). Ist die Weiche durch T_H1 -Zellaktivierung in Richtung Entzündung gestellt, werden kaum mehr Immunglobuline (Igs) gebildet. Umgekehrt fehlt die Makrophagenaktivierung, wenn T_H2 -Zellen aktiviert sind. Dies erklärt das Phänomen, dass der gleiche Erreger eine entzündliche Form einer Krankheit oder eine Form mit geringer Gewebsalteration auslösen kann. Jedoch konnte man mit Hilfe dieses dichotomen Einteilungsmusters eine Reihe von experimentellen Befunden, die sich insbesondere im Rahmen der näheren Erforschung von Autoimmunerkrankungen ergaben, nicht erklären. So ist bekannt, dass IL-17-produzierende Zellen (T_H17 -Zellen) existieren, welche sich nicht in das T_H1 / T_H2 -Schema eingliedern lassen (Weaver et al., 2007). T_H17 -Zellen sind gekennzeichnet durch eine Ko-Expression von IL-17, TNF- α , GM-CSF und IL-6. IL-23 ist ein wichtiger Überlebensfaktor für T_H17 -Zellen, deren Bedeutung bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis diskutiert wird.

Im Kontrast hierzu dienen $CD8^+$ T-Zellen, sog. CTLs, vornehmlich der Elimination Virus-, aber auch Bakterien-infizierter sowie bösartiger körpereigener Zellen.

CD4⁺ T-Zellen erkennen Peptid-Antigene nur, wenn diese durch MHC Klasse II-Moleküle dem T-Zell-Rezeptor präsentiert werden. CD8⁺ T-Zellen erkennen im Gegensatz dazu Peptide nur im Kontext mit MHC Klasse I-Molekülen (siehe 4.). T-Zellen erkennen Antigene ausschließlich im Kontext mit Selbst-MHC und sind dennoch in der Lage, zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Diese Eigenschaften erlangen sie in komplexen Selektionsprozessen, die sie während ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen. Hierbei spielen MHC-Moleküle eine entscheidende Rolle, da sie während der Selektion das „Selbst“ des Organismus verkörpern.

2.2. Der humane T-Zell-Rezeptor (TCR) (Davis et al., 1997)

Reife zirkulierende T-Lymphozyten exprimieren zu 95% an ihrer Oberfläche einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor, eine kleine Minderheit trägt einen $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor. Obwohl die Zielstrukturen von T-Zell-Rezeptor und Antikörper und die durch sie ausgelösten Effektor-Mechanismen gänzlich verschieden sind, sind sich sowohl ihre genetische Organisation als auch die Molekülstruktur sehr ähnlich, so dass die Struktur des T-Zell-Rezeptors mit einem Fab-Antikörperfragment vergleichbar ist (Garcia et al., 1996). Dennoch unterscheiden sich T-Zell-Rezeptoren von den membrangebundenen Immunglobulinen (Igs), die als B-Zell-Rezeptoren dienen: T-Zell-Rezeptoren besitzen nur eine Antigenbindungsstelle, B-Zell-Rezeptoren dagegen zwei, zudem werden Igs als Antikörper sezerniert wohingegen T-Zell-Rezeptoren nie sezerniert werden. Der T-Zell-Rezeptor, welcher die Antigenspezifität determiniert, wird zusammen mit Proteinen des CD3-Komplexes auf der Zelloberfläche exprimiert (Clevers et al., 1988). Der CD3-Komplex wird für den Transport des Gesamtkomplexes auf die Zelloberfläche sowie für die Signaltransduktion benötigt (Kearse et al., 1995). Der $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor ist ein Heterodimer aus zwei membranständigen glykosylierten Polypeptidketten, der α - und der β -Kette, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette setzt sich aus 4 Domänen zusammen: Zwei extrazelluläre Domänen, eine kurze verbindende Gelenkregion (hinge region), eine Transmembrandomäne und eine sehr kurze (2-7 AS) zytoplasmatische Domäne ohne Tyrosinkinaseaktivität. Beide Ketten des Rezeptors besitzen eine aminoterminal variable Region mit Homologie zu V-Regionen von Immunglobulinen und eine konstante Region mit Homologie zu C-Regionen von Immunglobulinen. Die Ketten des T-Zell-

Rezeptors falten sich weitgehend genauso wie die eines Fab-Fragments, wobei die Gesamtgestalt etwas kürzer und breiter ist. Ein wesentlicher struktureller Unterschied zu Fab-Fragmenten besteht in der Faltung der C_α -Kette, deren eine Hälfte ein β -Faltblatt, ähnlich einer immunglobulinartigen Domäne bildet, deren andere Hälfte jedoch aus locker gepackten Strängen und einem kurzen Segment einer α -Helix besteht. Weiterhin ist die Kontaktfläche zwischen den V- und C-Domänen beider T-Zell-Rezeptorketten ausgedehnter als in Antikörpern, was eine weniger flexible Gelenkverbindung zwischen beiden Ketten bedingt. Andere Unterschiede betreffen die Schleifen der CDRs, insbesondere der V_α -CDR2-Schleife und die Interaktion zwischen C_α - und C_β -Domäne, welche durch die Mitwirkung eines Kohlenhydrats charakterisiert ist.

Das T-Zell-Rezeptor- $\alpha\beta$ -Heterodimer erkennt seinen MHC-Peptid-Liganden und bindet an ihn, kann der Zelle aber nicht signalisieren, dass ein Antigen gebunden wurde. Im funktionsfähigen Zustand sind die $\alpha\beta$ -Heterodimere daher mit mehreren unterschiedlichen invarianten akzessorischen Ketten assoziiert. An der Zelloberfläche sind zwei $\alpha\beta$ -Heterodimere mit einem CD3 γ -, einem CD3 δ -, zwei CD3 ϵ - sowie einem ζ -Homodimer assoziiert. Die hydrophilen Sequenzbereiche des T-Zell-Rezeptors interagieren hierbei mit den entgegengesetzt geladenen Transmembranbereichen der γ -, δ -, ϵ -Ketten des CD3-Komplexes. Die Untereinheiten eines CD3-Komplexes besitzen spezielle Sequenzmotive, sog. Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenzen (ITAMs). Die ζ -Kette unterscheidet sich dadurch, dass sie nur eine kurze extrazelluläre Domäne aufweist, aber in ihrer zytoplasmatischen Domäne drei ITAMs besitzt. Die Tyrosinreste der ITAMs werden nach der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung phosphoryliert, was eine Erkennung durch zytoplasmatische Signalmoleküle ermöglicht. Weiterhin wird der CD3-Komplex für die Expression der antigenbindenden Kette an der Zelloberfläche benötigt.

2.3. Entwicklung von T-Lymphozyten, positive und negative Selektion

Thymusabhängige Lymphozyten entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark und reifen charakteristisch für diese Zellpopulation im Thymus. Sie durchlaufen dort während ihrer Entwicklung drei Stadien, welche sich anhand der Expression ihrer Korezeptormoleküle definieren lassen. Im ersten Stadium werden sie als doppelt negative

(DN) T-Lymphozyten bezeichnet, da sie weder CD4 noch CD8 exprimieren. In dieser Phase beginnt die somatische Rekombination einzelner Genelemente (Genrearrangement) sowie die Expression der T-Zell-Rezeptor- β -Kette (präTCR) (von Boehmer et al., 1997). Nach Expression geringer Mengen einer funktionellen β -Kette exprimieren die T-Zellen in der zweiten Entwicklungsphase sowohl CD4 als auch CD8 als Korezeptormolekül, weshalb man sie nun als doppelt positive (DP) $CD4^+CD8^+TCR\beta^-$ -T-Lymphozyten bezeichnet. Es kommt in der Folge zum Rearrangement der Gene der α -Kette und zu deren Expression. Nach Expression des heterodimeren $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors entstehen DP $CD4^+CD8^+TCR\alpha\beta^{hi}$ -Lymphozyten. Während dieser Phase werden die T-Lymphozyten sensibel für einen zweistufigen Selektionsprozess, der zum einen die Funktionalität und Reaktivität des T-Zell-Rezeptors gegenüber der im MHC-Komplex präsentierten Antigenen überprüft (positive Selektion) und zum anderen sicherstellt, dass kein T-Zell-Rezeptor exprimiert wird, der eine Reaktivität gegenüber Autoantigenen aufweist (negative Selektion) (Sebzda et al., 1999). Durch die beiden Selektionsprozesse sterben etwa 75% aller Prä-T-Zell-Rezeptor-exprimierenden Zellen, wobei der Vorgang der negativen Selektion (sog. zentrale Toleranz) nicht 100%ig effektiv ist, was man am Vorhandensein autoreaktiver T-Lymphozyten in der Peripherie gesunder Individuen festmachen kann. Die Ursache hierfür liegt in der Tatsache begründet, dass nicht alle organspezifischen peripheren Antigene im Thymus präsentiert werden (Starr et al., 2003; Walker et al., 2002). Autoreaktive T-Zellen werden peripher nochmals eliminiert (periphere Toleranz). Im Anschluss (drittes Stadium) differenzieren diejenigen DP-Lymphozyten, die einen mit MHC Klasse II-Molekülen reagierenden T-Zell-Rezeptor tragen, zu einfach positiven $CD4^+TCR\alpha\beta^{hi}$ -Lymphozyten, diejenigen, welche einen mit MHC Klasse I-Molekülen reagierenden T-Zell-Rezeptor tragen zu $CD8^+TCR\alpha\beta^{hi}$ -Lymphozyten. Erst dann ist die Thymusentwicklung abgeschlossen und die T-Zellen verlassen als naive $CD8^+$ - bzw. $CD4^+$ Zellen den Thymus über Lymphgefäße und Venolen und patrouillieren durch Blut, Lymphe, interstitielle Körperflüssigkeiten und die thymusabhängigen Bereiche der sekundären lymphatischen Organe. Treffen sie auf ihr Antigen, differenzieren sie unter der Einwirkung aktivierender Signale zu Effektorzellen.

3. Die humorale Immunabwehr

3.1. B-Lymphozyten

Die B- (bursa fabricii) Lymphozyten reifen im Knochenmark heran und vermitteln durch Produktion und Sekretion von Antikörpern (Reth, 1992) die humorale Immunabwehr. B-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche ein membranständiges Ig als Antigen-Rezeptor und können nach Stimulation des B-Zellrezeptors (BCR) durch Sezernierung von löslichen Igs (Antikörpern) mit nicht prozessierten und löslichen Antigenen reagieren. Die schwere und leichte Kette allein machen jedoch noch keinen vollständigen Zelloberflächenrezeptor aus. Das Immunglobulin erkennt das Antigen und bindet daran, kann aber selbst kein Signal erzeugen. Zu diesem Zweck ist es mit Signalmolekülen assoziiert, die nicht für das Antigen spezifisch sind: Ig α und Ig β . Diese besitzen an ihren zytoplasmatischen Anteilen jeweils ein einzelnes ITAM, mit dem sie Signale aussenden können, wenn der BCR an ein Antigen gebunden ist. Ig α und Ig β sind über Disulfidbrücken aneinander gekoppelt und mit der schweren Kette assoziiert. Antikörper können dreidimensionale, konformationsabhängige Strukturen in der Lösung und auf einer Zelloberfläche erkennen und sind somit auf eine Bekämpfung von Krankheitserregern in den extrazellulären Bereichen des Körpers spezialisiert. Jedoch sind viele Pathogene, z.B. Viren, welche sich intrazellulär vermehren, für sie nicht erreichbar. Neben der Antikörperproduktion besitzen B-Zellen auch die Fähigkeit Antigene zu internalisieren und diese T-Zellen zu präsentieren (Patel et al., 1993). Durch den hochaffinen Ig-Rezeptor werden antikörpergebundene exogene Antigene durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert, prozessiert und hauptsächlich auf MHC II-Molekülen präsentiert.

3.2. Entwicklung der B-Lymphozyten

Ausgehend von der multipotenten Knochenmarkszelle entwickeln sich B-Lymphozyten über die Pro-B-, Prä-B-I- und drei unterscheidbare Prä-B-II-Zellstadien bis zum ausdifferenzierten B-Lymphozyten (Hardy et al., 1991; Osmond et al., 1998). Diese Entwicklungsstadien unterscheiden sich aufgrund der Expression von Ig-Ketten und bestimmter Zelloberflächenproteine (Li et al., 1993). Pro-B-Zellen leiten sich von pluripotenten blutbildenden Stammzellen ab und weisen noch keine Oberflächen-Igs auf. Im frühen Pro-B-Zell-Stadium kommt es zur Rekombination von D_H und J_H, auf wel-

che im späten Pro-B-Zell-Stadium die Verknüpfung von V_H mit DJ_H folgt. In einem nächsten Schritt, dem sog. Prä-B-Zell-Stadium, wird eine intakte schwere μ -Kette mit einem Ersatz für die leichte Kette vorwiegend intrazellulär und in kleinen Mengen auch auf der Zelloberfläche in Form des Prä-B-Zell-Rezeptors exprimiert. Die Umordnung des Locus für die schweren Ketten und die Produktion des Leichtkettenersatzes werden nun gestoppt. Aus der großen Prä-B-Zelle entstehen durch Teilung kleine Prä-B-Zellen, in denen die Umordnung für die leichte Kette beginnt. Sobald ein Gen für die leichte Kette zusammengestellt und ein vollständiges IgM-Molekül auf der Oberfläche exprimiert wird, gilt die Zelle als unreife B-Zelle. Bis zu diesem Punkt ist die Entwicklung antigenunabhängig. Es kommt nun zu einer Selektion der unreifen B-Zellen auf Selbsttoleranz und danach ob sie in peripheren Lymphgeweben überleben können. Die verbleibenden B-Zellen differenzieren zu reifen B-Zellen, welche zusätzlich zu IgM IgD exprimieren (naive B-Zellen). Die reifen naiven B-Zellen zirkulieren durch Blut, Gewebe, Lymphe und Knochenmark und differenzieren in den sekundären lymphatischen Organen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen aus, wenn sie mit ihrem BCR auf ihr spezifisches Antigen treffen. Dieser Schritt erfordert gewöhnlich die Anwesenheit einer T-Helferzelle, welche sowohl den Isotyp- oder Klassenwechsel kontrolliert als auch eine Rolle bei der Auslösung der somatischen Hypermutation der Gene für die variablen Regionen der Antikörper spielt.

3.3. Antikörper und rekombinante Antikörper-Fragmente

3.3.1. Aufbau eines Antikörpermoleküls

In einem typischen Antikörpermolekül sind jeweils zwei identische leichte und schwere Polypeptidketten über Disulfidbrücken und nichtkovalente Bindungen zu einem Y-förmigen Molekül verbunden. Anhand ihrer schweren Ketten lassen sich Immunglobuline in fünf Hauptklassen (Isotypen) einteilen, welche als IgG, IgA, IgM, IgD und IgE bezeichnet werden. Antikörper des Isotyps IgG stellen den größten Anteil der humanen und murinen Serum-Immunglobuline dar. Daher soll der Aufbau eines Antikörpers anhand dieses Igs näher erläutert werden.

Ein IgG-Molekül besitzt eine Gesamtmasse von ca. 150 kD, wozu die beiden leichten Ketten mit jeweils ca. 25 kD und die beiden schweren Ketten mit jeweils ca. 50 kD beitragen. Betrachtet man die Struktur von leichter und schwerer Kette genauer, so fällt auf, dass die Proteinketten in einzelne Domänen von jeweils etwa 110 AS unter-

teilt werden können. So besteht eine leichte Kette aus einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne. Eine schwere Kette setzt sich aus einer variablen (V_H) und abhängig von dem Isotyp des Antikörpers aus drei (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) oder vier konstanten Domänen zusammen. Jede Domäne ist eine zylinderförmige Struktur, in der mehrere Polypeptidketten (β -Stränge) antiparallel zu zwei β -Faltblättern gepackt sind, die durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden. Die charakteristischen Muster Vier-plus-drei-Stränge (Domänentyp der C-Region) oder Vier-plus-fünf-Stränge (Domänentyp der variablen Region) sind typische Bausteine der Immunglobulin-Superfamilie, die man sowohl in Antikörpern als auch in T-Zell-Rezeptoren und in einer Reihe von anderen Proteinen findet. Viele AS, die bei den C- und V-Domänen im Zentrum von Igs gleich sind, liegen im Zentrum der Immunglobulinfaltung und sind entscheidend für die Stabilität der Struktur. Die Flexibilität eines Antikörpermoleküls wird durch zwei Bereiche bedingt; sowohl die Scharnier-(hinge) Region als auch die Regionen zwischen V_H - bzw. V_L - und C_H - bzw. C_L -Domänen sind relativ beweglich. Daneben existieren in den einzelnen Proteindomänen auch intramolekulare Disulfidbindungen, welche die Konformation der Domänen determinieren (Janeway, 2002). Während die AS-Sequenz im Bereich der konstanten Domänen bei verschiedenen Antikörpern eines Isotyps weitgehend gleich ist, zeigen sich innerhalb der variablen Domänen große Sequenzunterschiede. Diese sind jedoch nicht über die komplette variable Region verteilt, sondern konzentrieren sich auf drei hypervariable Domänen, den complementary determining regions (CDR). Die CDR sind zwischen Proteindomänen mit geringerer Sequenzvariabilität, den framework regions (FWR oder FR), eingebettet. Die FR besitzen β -Faltblattstruktur und ordnen sich räumlich so an, dass die CDRs im funktionell gefalteten Protein direkt nebeneinander liegen und in Schleifen nach außen zeigen. Über die hypervariablen Bereiche der Schwer- und Leicht-kette erfolgt die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen.

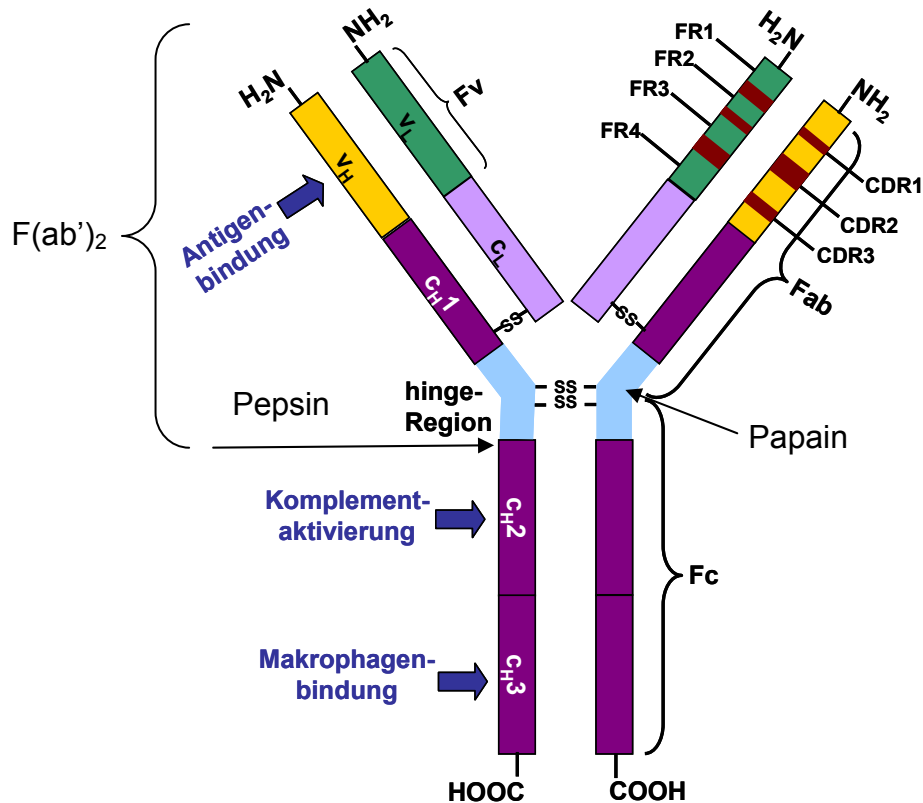


Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers; Abkürzungen: v_H : variable Domäne der schweren (heavy) Kette; v_L : variable Domäne der leichten (light) Kette; C_H1-3 : konstante Domänen der schweren Kette; c_L : konstante Domäne der leichten Kette; S-S: Disulfidbrücke; F_v : variables Fragment; Fab: antigenbindendes Fragment; F_c : konstantes Fragment (kristallisierbares Fragment); CDR: complementary determining regions; FR: framework regions

Sowohl für die leichte als auch für die schwere Antikörperkette existieren verschiedene Isotypen. Bei der Leichtkette wird zwischen κ - und λ -Ketten unterschieden, deren Verhältnis von Spezies zu Spezies stark variieren kann (Mensch: $\kappa:\lambda=2:1$). Ein Ig hat entweder nur κ - oder nur λ -Ketten, nie je eine. Für die schwere Kette existieren fünf Isotypen (μ , δ , γ , α , ϵ), nach denen das Antikörperrepertoire in fünf Hauptklassen (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE) eingeteilt wird. Die fünf Schwerekettenklassen variieren einerseits in der Anzahl der konstanten Domänen (drei für γ , α und δ , vier für μ und ϵ), andererseits in ihrer Struktur: So liegen IgG, IgD und IgE immer in Form eines Monomers vor, wohingegen IgM sowohl als Mono- als auch als Pentamer vorkommen kann und IgA sogar als Mono-, Di- und Trimer existiert. Ebenso ist der Isotyp der schweren Kette ausschlaggebend für die Funktion des Antikörpers.

3.3.2. Funktion von Antikörpern

Antikörper sind bifunktionelle Moleküle: Sie verbinden einen antigenbindenden Teil mit einem Effektoranteil in einem Molekül. Die Aufgaben dieser Bereiche bestehen in der spezifischen Erkennung und Bindung von Antigenen und der Einleitung ihrer Zerstörung mit Hilfe der Effektorfunktion. Antikörper können auf drei Weisen zur Immunität beitragen. Erstens können Antikörper sich an Pathogene anheften und somit eine spezifische Bindung des Pathogens an Oberflächenmoleküle verhindern. Diesen Vorgang bezeichnet man als **Neutralisierung**; er hindert Viren und intrazelluläre Bakterien daran, in Zellen einzudringen und hält bakterielle Toxine von der Zelle fern. Zweitens fördern Antikörper die Phagozytose von Bakterien, welche sich außerhalb der Zellen vermehren, was man als **Opsonisierung** bezeichnet. Antikörper beschichten hierbei die Oberfläche des Pathogens und Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche phagozytierender Zellen erkennen die konstante Region des Antikörpers. Eine Aktivierung von Phagozyten kann zur Aufnahme und Zerstörung von Pathogenen führen sowie eine Entzündung hervorrufen und Gewebeschäden verursachen. Effektorpopulationen sind v.a. natürliche Killerzellen, aber auch Makrophagen, Granulozyten sowie Mastzellen. Fc-Rezeptoren regen natürliche Killerzellen an, mit Antikörpern bedeckte Zielzellen zu zerstören, was man als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) bezeichnet. Ebenso können Mastzellen, Basophile und aktivierte Eosinophile über hochaffine Fc ϵ -Rezeptoren an IgE-Antikörper binden und so eine Abwehr gegen Parasiten gewährleisten. Die o.g. Vorgänge spielen bei der Elimination von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen sowie bei der Parasitenelimination durch Eosinophile eine Rolle. Weiterhin sind sie an Überempfindlichkeitsreaktionen beteiligt. Drittens können Antikörper, die an die Oberfläche eines Erregers binden, über eine Bindung an C1q zu einer kaskadenartigen **Komplementaktivierung** führen. Komplementproteine, welche an die Oberfläche des Pathogens gebunden haben, können auch als Opsonine wirken, indem sie an Komplementrezeptoren auf Phagozyten binden und so die Aufnahme und Beseitigung durch Phagozyten fördern. Des Weiteren werden kleine Peptide mit entzündungsspezifischer oder chemotaktischer Aktivität freigesetzt (v.a. C5a), welche Phagozyten zur Infektionsstelle locken. Zudem können bestimmte Mikroorganismen direkt osmotisch lysiert werden, indem mittels eines „Membran attack complex“ Poren in der Membran gebildet werden.

Die Isotypen der synthetisierten Antikörper entscheiden darüber, welcher Effektormechanismus bei einer bestimmten Antwort zum Einsatz kommt. Im Laufe des Lebenszyklus einer B-Zelle können unterschiedliche Isotypen der schweren Kette exprimiert werden. Am Ende einer jeden B-Zellreifung werden immer IgM- und IgD-Moleküle als membrangebundene BCRs exprimiert. Im Rahmen einer primären Immunantwort werden pentamere IgM-Moleküle sezerniert, welche zwar eine hohe Avidität (insgesamt zehn Antigenbindungsstellen) besitzen, jedoch eine relativ geringe Affinität, da sie entstehen, bevor die Ig-Gene der B-Zellen eine somatische Hypermutation durchgemacht haben. Im weiteren Verlauf der Immunantwort besteht für den B-Lymphozyten die Möglichkeit, einen anderen Isotyp zu exprimieren, was durch den Austausch des konstanten Teils der Schwerekette geschieht. Diesen Klassen- oder Isotypwechsel bezeichnet man als „class switch“. Hierbei bleibt die Antigenspezifität erhalten, es kommt lediglich zu einer Änderung der Ig-Klasse und somit der biologischen Aktivität des Antikörpers. Die verschiedenen Isotypen sind außerdem so ausgelegt, dass sie in verschiedenen Bereichen des Körpers ihre Funktion ausüben können. **IgM-Moleküle** findet man aufgrund ihrer Größe v.a. im Blut und in kleineren Mengen in der Lymphe. Bedingt durch ihre pentamere Struktur können sie besonders gut das Komplementsystem aktivieren. Eine gewisse Menge IgM wird aber sowohl in späteren Phasen als auch nach somatischer Hypermutation gebildet, obwohl dann andere Isotypen überwiegen. Antikörper der Klassen **IgG**, **IgA** und **IgE** sind kleiner und können daher leichter vom Blut ins Gewebe diffundieren. IgA kann zwar Dimere (Sekretionsform von IgA) bilden, jedoch liegen IgG und IgE immer als Monomere vor, weshalb für sie die Affinität der einzelnen Bindungsstellen für das Antigen von entscheidender Bedeutung ist. IgG ist der häufigste Isotyp im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten, IgA dagegen in Sekreten, v.a. in Schleimdrüsen des Darms und des Atemtraktes. IgG opsonisiert effizient Pathogene für die Aufnahme durch Phagozyten, aktiviert das Komplementsystem und neutralisiert Toxine, die man in Geweben findet, wohingegen IgA hauptsächlich ein neutralisierender Antikörper auf den Schleimhäuten ist, was sich aufgrund des Vorkommens gut erklären lässt, da an der Körperoberfläche weder Komplement noch Phagozyten regelhaft vertreten sind. Weiterhin ist IgG als einziges Immunglobulin plazentagängig und vermittelt dem Neugeborenen gemeinsam mit dem mittels der Muttermilch aufgenommenen IgA eine sog. Leihimmunität, bis es eigene protektive Antikörper synthetisieren kann. Im

Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit findet man nur geringe Konzentrationen an IgE-Antikörpern, welche stark an Rezeptoren auf Mastzellen binden können, die sich direkt unterhalb der Haut und der Mucosa sowie entlang der Blutgefäße im Bindegewebe befinden. Kommt es durch eine Antigenbindung an dieses IgE zu einer Quervernetzung (Bridging) mittels IgE, führt dies zu einer Mastzellaktivierung mit Mediatorfreisetzung (sog. Mastzelldegranulation).

3.3.3. Erzeugung des Antikörperrepertoires

3.3.3.1. Antikörpervielfalt durch somatische Rekombination

Ein Organismus ist theoretisch in der Lage, gegen jedes erdenkliche Antigen einen Antikörper mit passender Spezifität zu generieren. Das humane Antikörperrepertoire besteht nach Schätzungen aus mind. 10^{11} verschiedenen Antikörperspezifitäten. Allerdings wird es einerseits dadurch limitiert, dass die Gesamtzahl der Lymphozyten, die sich zu einem beliebigen Zeitpunkt im Blut und den lymphatischen Organen befindet, nur bei 10^9 Zellen liegt, andererseits durch die Begegnungen des Individuums mit Antigenen. Würde jeder der unterschiedlichen Antikörper, wie früher gemäß der Keimbahntheorie von A. Weismann postuliert wurde, durch ein eigenes Gen kodiert, wäre alleine durch die Anzahl der Immunglobulingene die Gesamtgröße des humanen Genoms gesprengt. Die enorme Diversität der Antikörper beruht auf folgenden Grundlagen: Erstens der **somatischen Rekombination** (Tonegawa, 1983; Tonegawa, 1988), welche durch die Verknüpfung zahlreicher verschiedener V-, D- und J-Gensegmente eine kombinatorische Vielfalt herstellt, zweitens durch eine ungenaue Verknüpfung (sog. **junktionale Vielfalt**); drittens erhöht sich die Variabilität des Antikörperrepertoires durch die **Kombination schwerer und leichter Ketten** und viertens findet im Rahmen der Affinitätsreifung in den Keimzentren eine **somatische Hypermutation** (Wagner et al., 1996) statt. Der Grundmechanismus der Genumlagerung ist in B- und T-Zellen gleich. Lediglich die somatische Hypermutation findet in T-Zellen nicht statt. Die vier Mechanismen der Antikörpervielfalt werden im Folgenden kurz beschrieben.

3.3.3.2. Organisation der humanen Antikörpergencluster (Janeway, 2002; Tonegawa et al., 1978)

a) Die Gencluster für die leichte Kette

Der Locus des humanen κ -Genclusters befindet sich auf Chromosom 2. Er besteht aus ca. 40 funktionellen V_{κ} -Segmenten, die durch ein großes Intron von den 5 J_{κ} -Segmenten getrennt sind. Kurz hinter dem letzten J-Segment befindet sich ein einzelnes C_{κ} -Gensegment (Abb. 2A). Neben den funktionellen V-Segmenten gibt es auch zahlreiche Pseudogene. Zudem ist bei etwa der Hälfte aller Menschen das V_{κ} -Gencluster dupliziert.

Das humane λ -Gencluster liegt auf Chromosom 22 und ist anders aufgebaut als der κ -Gencluster. Auf eine Gruppe von ca. 30 funktionellen V_{λ} -Gensegmenten folgen 4 J_{λ} -Segmente, wobei jedes J-Segment mit einem eigenen C_{λ} -Segment verbunden ist (Abb. 2B).

b) Die Gencluster für die schwere Kette

Der Gencluster für die humane schwere Antikörperkette erstreckt sich auf Chromosom 14 über insgesamt 2 Megabasen und ähnelt dem Locus für die leichte κ -Kette. Auf ca. 65 funktionelle V_H -Gensegmente folgen 27 D_H - und 6 J_H -Segmente, die nahezu beliebig miteinander kombiniert werden können (Abb. 2C). Im Wesentlichen unterscheidet sich der Locus der schweren Kette dadurch, dass er eine Reihe von C-Regionen enthält, wobei jede einem anderen Isotyp entspricht. Die Gensegmente für die konstante Region der schweren Kette bilden einen ca. 200 kb großen Gencluster auf der 3'-Seite der J_H -Gensegmente (Abb. 2D). Jedes C_H -Gensegment besteht wiederum aus mehreren Exons (der Einfachheit halber in der Abb. nicht dargestellt), wobei jedes Exon eine eigene Proteindomäne kodiert. Das C_{γ} -Segment besteht beispielsweise aus vier Exons, wobei drei davon für die unterschiedlichen C_H -Domänen kodieren und das vierte Exon für die Hinge-Region.

Die Ig-Ketten sind extrazelluläre Proteine. Da die funktionelle Faltung des Antikörpers im ER erfolgt, befindet sich vor jedem V-Gen-Segment ein für das Leader-Peptid (L) kodierendes Exon, welches das Protein in den sekretorischen Stoffwechselweg ausschleust und anschließend abgeschnitten wird.

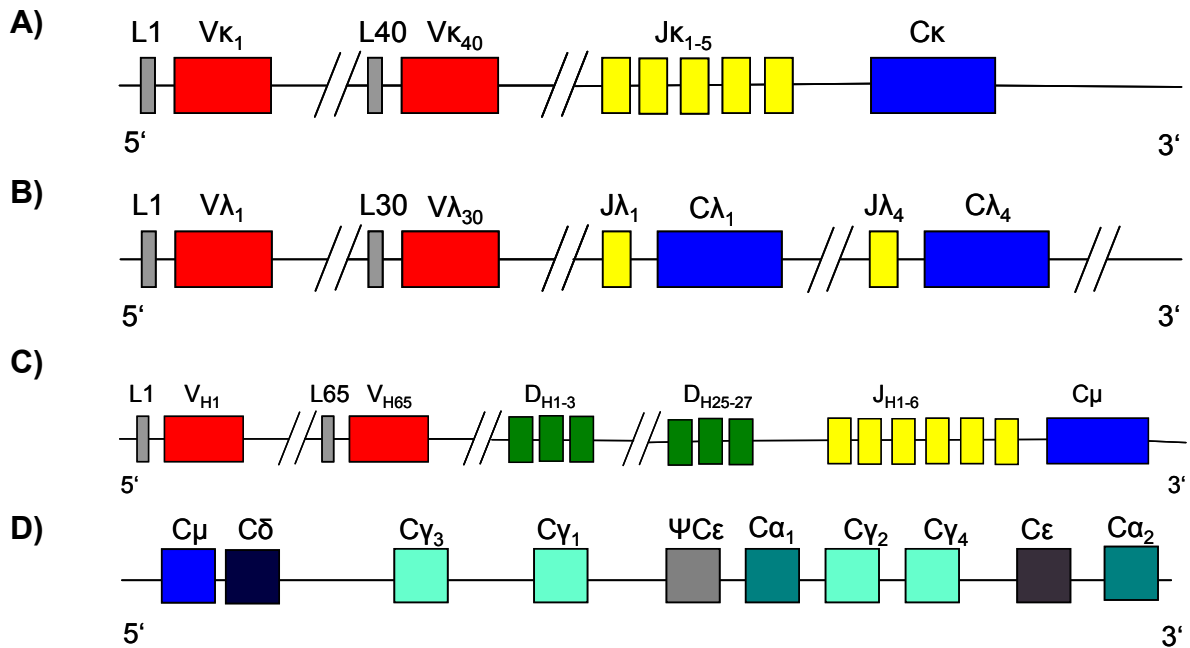


Abb. 2: Organisation des humanen Antikörperclusters; A) Aufbau des κ -Genclusters (Chromosom 2); **B)** Aufbau des λ -Genclusters (Chromosom 22); **C)** Aufbau des Genclusters für die schwere Kette (Chromosom 14); **D)** Organisation der Gensegmente für die konstante Region der schweren Kette (Chromosom 14)

3.3.3.3. Der Mechanismus der somatischen V(D)J-Rekombination

Susumu Tonegawa erhielt 1986 den Robert-Koch-Preis und 1987 den Nobelpreis für Medizin aufgrund seiner Entdeckung der genetischen Grundlage des Variationsreichtums der Antikörper. Aus einer relativ geringen Anzahl vererbter Sequenzen kommt es an jeder DNA-Sequenz, welche für eine variable Region kodiert, zu einer Kombination verschiedener Gensegmente. Jenen Mechanismus, durch den verschiedene Gensegmente zu kompletten Antikörpergenen zusammengesetzt werden, nennt man Immunglobulin-Rearrangement oder somatische V(D)J-Rekombination. Der Vorgang der Rekombination findet nur zu bestimmten Zeitpunkten während der B-Zellentwicklung statt und unterliegt bestimmten Regeln.

Jede variable Domäne einer leichten Kette wird von zwei unterschiedlichen DNA-Abschnitten kodiert: Der Erste wird als V-Gen-Segment bezeichnet und umfasst die ersten 95-101 AS der leichten Kette, der Zweite als J-Gensegment (von joining für verbindend abgeleitet) bezeichnete Abschnitt kodiert den Rest der variablen Domäne. Die Verknüpfung von V- und J-Gensegment führt zu einem durchgehenden Exon, das die ganze variable Region der Leichtkette kodiert. Die variablen Regionen der

schweren Kette werden zusätzlich von einem dritten, sog. D_H-Gen-Segment (von diversity für Vielfalt abgeleitet) kodiert, das zwischen V_H und J_H lokalisiert ist. Zunächst werden D- und J-Gen-Segment miteinander verknüpft. An die DJ-Sequenz wird anschließend das V-Gen-Segment angefügt, so dass ein vollständiges V_H-Exon entsteht. Gensegmente, die sich zwischen kombinierten Segmenten befinden, werden in der Regel deletiert. Anschließend wird die DNA in die primäre RNA transkribiert. Im Rahmen der RNA-Prozessierung werden die Introns und die überzähligen J-Segmente durch Spleißen entfernt.

Sowohl bei der leichten als auch bei der schweren Kette erfolgt die Verbindung der zusammengebauten V-Region-Sequenz mit dem benachbarten C-Region-Gen durch RNA-Spleißen. Die ausschließlich in B- und T-Lymphozyten vorkommenden Enzyme RAG-1 und RAG-2 (Recombination Activating Gene) spielen bei der V(D)J-Rekombination eine entscheidende Rolle. Die DNA-Bereiche, in denen Rekombinationen erfolgen können, sind durch sog. Rekombinationssignalsequenzen (RSS) „markiert“. Die RSS bestehen aus einem Heptamer (Block aus sieben Nukleotiden) gefolgt von einem Nonamer (Block aus neun Nukleotiden), welche durch einen Spacer aus 12 oder 23 Basen getrennt sind. Die V(D)J-Rekombination erfolgt nach der 12/23-Regel: Ein Gensegment, das von einem 12 bp-Spacer flankiert wird, kann nur mit einem durch einen 23 bp-Spacer markierten Gensegment verknüpft werden. Dies dient dazu, dass es beim Rearrangement der schweren Antikörperkette nicht zu einer direkten Verknüpfung von V_H- und J_H-Segment kommt.

3.3.3.4. Weitere Mechanismen zur Erzeugung der Antikörpervielfalt

Neben dem Prozess der somatischen Rekombination gibt es noch weitere Mechanismen, die an der Entstehung des Antikörperrepertoires beteiligt sind.

Theoretisch kann jede der 320 (40x5+30x4) leichten Ketten mit jeder der 10.530 (65x27x6) schweren Ketten kombiniert werden (**kombinatorische Diversität**). Dies ließe die Generierung von $3,4 \times 10^6$ verschiedenen Antikörpern zu, was in der Praxis jedoch dadurch eingeschränkt wird, dass nicht jede Kombination ein stabiles Molekül ergibt.

Eine zusätzliche Antikörpervielfalt ermöglicht die Einführung von P- oder N-Nukleotiden an der Verknüpfungsstelle (**junktionale Vielfalt** (Gauss et al., 1996)).

Bei der P-Nukleotid-Addition werden während der V(D)J-Rekombination intermediär gebildete Haarnadelstrukturen beliebig aufgespalten, wodurch ein einzelsträngiges DNA-Ende entsteht. Je nach Lage des Schnittes kann die einzelsträngige DNA Nukleotide enthalten, die ursprünglich in der doppelsträngigen DNA komplementär waren. so dass kurze palindromische Sequenzen, sog. P (P steht für Palindrom)-Nukleotide, in der CDR3-Region entstehen. Neben den P-Nukleotiden werden durch das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) nach dem Zufallsprinzip N-Nukleotide (N steht für nontemplated, d.h. ohne Matrize) an die einzelsträngigen DNA-Enden angefügt. Da die Anzahl der durch die o.g. Mechanismen angefügten Nukleotide zufällig ist, kommt es häufig zu einer Verschiebung des Leserasters, was zu einem funktionslosen Protein und somit letztendlich einer unproduktiven Umlagerung führt. Da nur etwa jede 3. Umlagerung produktiv ist, können viele B-Zellen keine funktionsfähigen Immunglobuline erzeugen.

Im Rahmen einer sekundären Immunantwort trägt noch ein weiterer Mechanismus zur Erhöhung der Antikörpervielfalt und Affinität gegenüber einem Antigen bei, die **somatische Hypermutation**. Durch eine stark erhöhte Rate an Punktmutationen im Bereich der variablen Regionen aktivierter B-Zellen erscheinen mutierte B-Zellrezeptoren auf deren Oberfläche. Einige der mutierten Ig-Moleküle binden besser an Antigene als die ursprünglichen B-Zell-Rezeptoren, so dass die B-Zelle mit einer deutlich verbesserten Affinität Antigen binden kann. B-Zellen, die das Antigen nicht mehr binden können, sterben im Prozess der negativen Selektion. B-Lymphozyten, die Mutationen akkumuliert haben, welche die Antigenbindung verbessern, können erfolgreich um die Antigenbindung konkurrieren und Signale empfangen, die ihre Proliferation und Ausbreitung weiter fördern. Den Prozess der Selektion und klonalen Expansion solcher B-Lymphozyten mit verbesserter Affinität zum Antigen nennt man Affinitätsreifung der Antikörperpopulation. Die somatische Hypermutation tritt auf, wenn B-Zellen nach Signalen von aktivierten T-Zellen auf ein Antigen reagieren. Die Mutationen sind zwar über die gesamte variable Region verteilt, erfolgen jedoch in gewissen Bereichen (hotspots) bevorzugt. Der eigentliche Vorgang der somatischen Hypermutation ist ein komplexer, bis heute noch nicht gänzlich erforschter Vorgang (Papavasiliou et al., 2002).

3.3.4. Monoklonale Antikörper, rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente

3.3.4.1. Entwicklung monoklonaler Antikörper

Aufgrund der hohen Spezifität und Stabilität wurde die große Bedeutung von Antikörpern für Forschung und Diagnostik bereits früh erkannt. Allerdings kamen bei der frühen immunologischen Forschung polyklonale Antikörper zum Einsatz, welche für viele Anwendungen nur bedingt geeignet sind. Einen Meilenstein stellte die von G. Köhler und C. Milstein 1975 veröffentlichte Hybridomtechnologie dar, mit der es möglich wurde, einen ganz bestimmten Antikörper in nahezu beliebiger Menge zu produzieren. Durch Fusion einer antikörperproduzierenden B-Zelle mit einer immortalen Myelomzelle entsteht eine sog. Hybridomzelle, die dauerhaft monoklonale Antikörper sezerniert. Monoklonale Antikörper sind heutzutage sowohl in der Analytik als auch in der medizinischen Diagnostik und Therapie unentbehrlich. So finden sie beispielsweise Verwendung im Enzymimmunoassay (ELISA), im Radioimmunoassay (RIA), bei der Immunelektrophorese, bei der immunologischen Detektion eines Western Blots oder bei verschiedenen Immunfluoreszenztechniken (z.B. FACS, Immunfluoreszenzmikroskopie).

Für den therapeutischen Einsatz hingegen sind murine Antikörper eher ungeeignet, da sie im menschlichen Organismus eine Immunreaktion hervorrufen, die mit einer Bildung von humanen Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) einhergeht. Die Konsequenz ist, dass sie am Menschen nur ein einziges Mal angewendet werden können. Sowohl die Immortalisierung humaner B-Lymphozyten durch EBV als auch die Erzeugung transgener Mäuse oder die Etablierung einer humanen Myelomzelllinie zur Generierung humaner Hybridomzellen lieferten keinen zufriedenstellenden Erfolg, da all diese Methoden durch eine Reihe von Faktoren limitiert sind: Instabilität der verwendeten Zelllinien, geringe Antikörperausbeuten, ethische Grenzen bei der Immunisierung von Menschen und der Einschränkung auf nicht-letale bzw. nicht-toxische Antigene.

3.3.4.2. Antikörperfragmente

a) Proteolytische Spaltung von Immunglobulinen

Mit Hilfe von Proteasen ließ sich die Struktur von Antikörpermolekülen untersuchen und somit feststellen, welche Teile des Moleküls für die verschiedenen Funktionen

verantwortlich sind (s. Abb. 1). Eine begrenzte Verdauung mit der Protease Papain spaltet Antikörpermoleküle aminoterminal von den Disulfidbrücken in drei Fragmente (Porter, 1959). Zwei Fragmente sind identisch und enthalten die antigenbindende Aktivität, weshalb man sie als Fab-Fragmente (fragment antigen binding) bezeichnet. Die Fab-Fragmente enthalten die vollständigen leichten Ketten, die mit den V_H - und C_H1 -Domänen der schweren Kette verbunden sind. Das andere Fragment, welches leicht zu kristallisieren ist, wird als Fc-Fragment (fragment crystallizable) bezeichnet. Es entspricht den aneinander gelegten C_H2 - und C_H3 -Domänen und ist der Teil des Antikörpermoleküls, der mit Effektormolekülen und –zellen interagiert. Eine andere Protease, Pepsin, spaltet in der gleichen Region des Antikörpers, jedoch auf der carboxyterminalen Seite der Disulfidbrücke (Nisonoff et al., 1960). Dabei entsteht das sog. $F(ab')_2$ -Fragment, in dem die beiden antigenbindenden Arme des Antikörpers miteinander verknüpft bleiben. Das restliche Stück der schweren Kette wird in mehrere kleine Fragmente geschnitten. Das $F(ab')_2$ -Fragment besitzt genau dieselben Bindungseigenschaften für das Antigen wie der ursprünglich Antikörper, kann jedoch nicht mit Effektormolekülen in Wechselwirkung treten, weshalb es sowohl für therapeutische Anwendungen als auch für die Erforschung der Rolle der Fc-Region von besonderer Bedeutung ist.

b) Rekombinante Antikörperfragmente

Mit Hilfe der rekombinanten Antikörpertechnologie wurde ein neuer, auf gentechnologischen Methoden basierender Weg zur Herstellung monoklonaler Antikörper gefunden. Hierbei werden Antikörper in vitro in Bakterien oder Zellkulturen (heterologe Expression) hergestellt. Für die Spezifität eines Antikörpers entscheidend ist der antigenbindende Teil, wobei man zugunsten höherer Ausbeuten in vielen Expressionssystemen auf den Rest des Antikörpers verzichtet. Neben den Fab-Fragmenten spielen auch sog. Fv-Fragmente, die kleinsten funktionsfähigen antigenbindenden Moleküle eine wichtige Rolle. Sie bestehen nur noch aus den variablen Domänen der leichten und schweren Kette. Diese Fv-Fragmente besitzen jedoch aufgrund der nicht kovalenten Bindung der beiden variablen Regionen nur eine sehr geringe thermodynamische Stabilität. Daher ist es sinnvoll, die beiden variablen Domänen über eine artifizielle Disulfidbrücke (dsFv) oder ein Linkerpeptid (scFv) zu verbinden.

Hierbei ist besonders die bakterielle Expression in ihrer Schnelligkeit und einfachen Handhabung unübertroffen. Zudem gestattet sie nicht zuletzt aufgrund ihrer weit

entwickelten Technologie der E. coli-Genetik relativ einfache Manipulationen auf genetischer Ebene. Somit wurde die Herstellung chimärer Maus-Mensch-, humanisierter und vollständig humaner Antikörperfragmente im Reagenzglas möglich. Dank der Methoden der modernen Molekularbiologie und Kombinatorik ist es heute möglich, aus hochkomplexen Antikörper-Genbibliotheken in E. coli mit Hilfe der Phage-Display-Technologie vollständig humane Antikörper gegen nahezu jedes Antigen zu selektionieren. Ein weiterer Vorteil stellt die geringe Größe der Antikörperfragmente dar. Eine homogenere Bioverteilung und bessere Gewebegängigkeit machen sie zu interessanten Kandidaten für den Einsatz in der Krebsdiagnostik und –therapie. Letztendlich können auch definierte Fusionen an beliebige Komponenten, wie Radioisotope, Enzyme oder Toxine vorgenommen werden. Durch genetische Manipulationen können Spezifität und Affinität von Antikörpern verändert werden, so dass Alles in Allem maßgeschneiderte Antikörper für Forschung, Diagnostik und Therapie entstehen mit erweiterten, neuartigen Funktionen, die natürliche Antikörper nicht besitzen (Breitling, 1997).

3.3.5. Antikörper als in-vivo-Diagnostika und Therapeutika

Seit einigen Jahren sind Antikörper nicht nur als Hilfsmittel in der Grundlagenforschung und der Laboratoriumsdiagnostik etabliert, sondern erlangen sowohl in der in-vivo-Diagnostik als auch in der Therapie eine immer größere Rolle (Borrebaeck et al., 2001; O'Mahony et al., 2006; van Dijk et al., 2001). Besonders deutlich werden die Fortschritte bei der Therapeutika-Entwicklung, da hier Antikörper und deren rekombinante Verwandte mittlerweile mehr als 30% aller Proteine darstellen, die sich in der klinischen Erprobungsphase befinden (Todorovska et al., 2001). Antikörper können aufgrund ihrer spezifischen Bindung an ihrer Zielstruktur diese blockieren oder auch markieren. Des Weiteren sind sie in der Lage, das Immunsystem zu aktivieren und eine Zerstörung der Zelle mit der entsprechenden Zielstruktur einzuleiten. Über Antikörper ist außerdem ein sog. „Drug-Targeting“ möglich, bei dem ein Arzneistoff selektiv an den Wirkort transportiert wird (z.B. der humanisierte Anti-CD33-Antikörper Gemtuzumab-Ozogamicin, Mylotarg®). Als Hauptindikationen für den Einsatz von Antikörpern haben sich mittlerweile Tumor- und immunologische Erkrankungen herauskristallisiert.

1986 erhielt der erste Antikörper, Muromonab-CD3 (Orthoclone® OKT3), ein muriner monoklonaler Antikörper, welcher durch seine Bindung an die ϵ -Kette des CD3-Proteins die Effektorfunktion von T-Lymphozyten sowie deren Proliferation inhibiert, von der amerikanischen Gesundheitsbehörde (FDA) seine Zulassung. 1994 wurde mit Edrecolomab (Panorex®), einem murinen monoklonalen Antikörper, der erste Antikörper zur Krebstherapie in Deutschland zugelassen. Durch Bindung an das Oberflächenglykoprotein 17-1A, welches in Tumorzellen überexprimiert wird, kommt es einerseits zur Aktivierung der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC), andererseits zur Aktivierung der Komplement-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (CDCC). Mit Abciximab (ReoPro®), das den Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche blockiert, erhielt 1995 erstmals ein chimäres Fab-Fragment die Zulassung. Ein Novum stellte das 2000 zugelassene Etanercept (Enbrel®) dar, welches bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis zum Einsatz kommt. Es handelt sich um ein Fusionsprotein aus dem Fc-Teil eines Antikörpers und den extrazellulären Domänen zweier TNF- α -Rezeptoren, wobei der Fc-Teil lediglich der Proteinstabilisierung dient, wohingegen die Wirkung über die TNF- α -Rezeptordomäne vermittelt wird. Für die gleiche Indikation wurde 2003 der erste komplett humane Antikörper, Adalimumab (Humira®) zugelassen, welcher über die Phage-Display-Technology aus einer humanen Antikörperbibliothek isoliert wurde. Insgesamt sind in Deutschland aktuell 19 monoklonale Antikörper als Therapeutika für die unterschiedlichsten Indikationen zugelassen (Paul-Ehrlich-Institut, Stand: 08.10.2008).

Wie oben angeführt kommen Antikörperfragmente auch bei der in-vivo-Diagnostik zum Einsatz. Hierbei werden die Proteine mit radioaktiven Isotopen, beispielsweise ^{99m}Tc , gekoppelt. Hauptanwendungsgebiete sind die Tumordarstellung und die Detektion von Entzündungsherden im Körper.

4. MHC-Moleküle und Antigenpräsentation

Beim Menschen liegen die Gene des Majorhistokompatibilitätskomplexes (MHC = major histocompatibility complex) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und werden als HLA (human leukocyte antigen)-Komplex bezeichnet (Campbell et al., 1993). Die Aufgabe von MHC-Molekülen besteht darin, T-Zellen Peptidfragmente zu präsentieren (Bjorkman et al., 1990), welche diese nur im HLA-Kontext erkennen, so dass diese aktiviert werden. Weitere Folgen einer solchen Präsentation können eine

Aktivierung von Makrophagen oder B-Zellen, die konsekutiv Antikörper produzieren, sein. Bei den HLA-Molekülen handelt es sich um polygene, polymorphe Transmembranglykoproteine, die man in zwei verschiedene Klassen unterteilt: MHC Klasse I und MHC Klasse II. Wahrscheinlich verhindern Polygenie und Polymorphismus, dass ein Pathogen der Präsentation durch Mutation aufgrund eines hohen Selektionsdrucks entgeht.

4.1. HLA Klasse I-Moleküle

4.1.1. Struktur der HLA Klasse I-Moleküle

Man bezeichnet die humanen Gene für MHC Klasse I-Moleküle, die mit Ausnahme des ZNS und anderer immunprivilegierter Organe auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, als HLA-A, HLA-B und HLA-C. Die genaue Struktur wurde erstmalig durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Bjorkman et al., 1987). Demnach handelt es sich um ein Heterodimer, das aus einer schweren, glykosylierten, die Membran durchspannenden α -Kette und dem nichtkovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin, welches, obwohl es einen Teil des MHC Klasse I-Moleküls darstellt, auf Chromosom 15 lokalisiert ist, besteht. Der extrazelluläre Teil der schweren Kette (44 kD) ist in drei Domänen gegliedert: α_1 , α_2 und α_3 . α_1 - und α_2 -Domäne bilden durch Paarung eine an den seitlichen Enden geschlossene Peptidbindungsfurche aus (Bjorkman et al., 1990). Die α_3 -Domäne, welche die Membran durchspannt und das β_2 -Mikroglobulin ähneln sowohl in der Primär- als auch in der Tertiärstruktur stark den konstanten Domänen von Antikörpern. Vor allem die α_1 - und α_2 -Domäne zeichnen sich durch einen extremen Polymorphismus aus, wohingegen die α_3 -Domäne kaum polymorph ist (Parham et al., 1996). Für zahlreiche HLA Klasse I-Allele sind Subtypen definiert worden. Untersuchungen zur Struktur verschiedener MHC-Peptid-Komplexe lieferten detaillierte Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen MHC Klasse I-Molekülen und Peptiden (Madden, 1995). Die Peptide werden in einer gestreckten Konformation gebunden und liegen in der Spalte parallel zur α_1 -Helix. Die Aminosäure-Seitenketten, die an der Ausbildung der Spalte beteiligt sind, bilden eine irreguläre Oberfläche, so dass entlang der Spalte insgesamt sechs Taschen A, B, C, D, E und F entstehen, in denen die Seitenketten des Peptids verankert werden können (Matsumura et al., 1992). Die 8-10 AS langen Peptide werden einerseits unabhängig von ihrer Sequenz durch Fixierung der Amino- und Carboxyenden des

Peptids mittels konservierender Tyrosinreste an beiden Enden der Peptidbindungsfurche verankert sowie andererseits über die allelspezifischen Bindungstaschen B, C und F im Boden der Peptidbindungsfurche. Die Seitenketten des Peptids, die nach unten gerichtet sind, können vollständig in diesen Taschen aufgenommen werden, weshalb diese Positionen Anker-Aminosäuren (anchor position) genannt werden. Jedes HLA-Antigen hat mindestens eine solche Tasche. Durch den extremen Polymorphismus der HLA-Antigene unterscheidet sich die Struktur der Taschen bei verschiedenen HLA-Typen, was folglich nur eine Bindung von Peptiden mit bestimmten Aminosäuren in den Ankerpositionen ermöglicht (Cano et al., 1998; Elliott et al., 1993; Jardetzky et al., 1991; Rotzschke et al., 1992). Die anderen Peptidreste können hingegen variieren und unterscheiden sich auch in der Orientierung der Seitenketten. Im Falle von HLA-A*0201 sind Leucin und Valin die bevorzugten Anker-Aminosäuren. Es wurden jedoch auch Peptide isoliert mit Leucin, Isoleucin oder Methionin am C-Terminus (Falk et al., 1993).

4.1.2. Funktion der HLA Klasse I-Moleküle

Die HLA Klasse I-Moleküle binden in der Regel kurze Peptide, welche Bruchstücke körpereigener Zellbestandteile oder intrazellulär lebender Parasiten, z. B. Viren, darstellen. Diese Proteinfragmente werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Stammen die Peptide von einem in der Zelle normalerweise nicht vorhandenen Pathogen, zum Beispiel einem viral kodierten Protein, werden die entstehenden MHC-Peptid-Komplexe von CTLs erkannt und die infizierten Zellen eliminiert. T-Zell-Rezeptoren erkennen immunogene Peptide nur, wenn sie im Komplex mit körpereigenen MHC-Molekülen gebunden sind, eine Eigenschaft, die als MHC-Restriktion bezeichnet wird.

Zytoplasmatische Peptide werden zunächst mit Hilfe des Proteasoms (Goldberg et al., 1992; Hilt et al., 1996; Niedermann et al., 1996), einem multikatalytischen Komplex degradiert. Hierzu werden die zytosolischen Proteine zunächst durch Ubiquitinierung entfaltet und anschließend im Proteasom in Peptidstücke gespalten (Hendil et al., 2004). Die Proteasomsynthese selbst kann durch das inflammatorische Zytokin IFN γ gesteigert werden, was einem erhöhten Bedarf an Antigenprozessierung und -präsentation Rechnung trägt. Schließlich gelangen die Peptide überwiegend über den ATP-abhängigen TAP (transporter associated with antigen processing)-

Transporter in das endoplasmatische Retikulum (ER), dem Syntheseort der MHC-Moleküle (Ortmann et al., 1994). Die MHC-Moleküle, welche vor ihrer Beladung mit Chaperonen assoziiert sind, erlangen erst durch die Peptidbindung ihre vollständige Faltung und Stabilität (Fahnestock et al., 1992) und werden danach über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (Heemels et al., 1995; Pamer et al., 1998).

4.2. HLA Klasse II-Moleküle

4.2.1. Struktur der HLA Klasse II-Moleküle

Die Kodierung der MHC Klasse II-Moleküle, welche nur auf immunkompetenten Zellen wie B-Lymphozyten, aktivierten T-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen Langerhanszellen sowie Epithelzellen des Thymus exprimiert werden, erfolgt in drei Genloci: HLA-DR, -DQ, -DP. MHC Klasse II-Moleküle bestehen aus zwei glykosylierten, nichtkovalent gebundenen Ketten, α und β , die beide die Membran durchspannen. Jede Kette besteht aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (α_1 und α_2 bzw. β_1 und β_2), wobei die Peptidbindungsfurche von der α_1 - und β_1 -Domäne gebildet werden, die beide hochpolymorph sind. Im Gegensatz zu MHC Klasse I-Molekülen ist die Bindungsfurche weiter geöffnet, was zur Folge hat, dass die Peptidenden wesentlich zugänglicher sind als bei den MHC Klasse I-Molekülen bei denen sie größtenteils im Inneren des Moleküls verborgen sind. Weiterhin können auch längere Peptidketten binden, deren Enden seitlich aus der Bindungsgrube herausragen.

4.2.2. Funktion der HLA Klasse II-Moleküle

Die HLA Klasse II-Moleküle dienen der Präsentation extrazellulärer Peptidfragmente, welche durch Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose in intrazelluläre Vesikel antigenpräsentierender Zellen aufgenommen wurden (Bjorkman et al., 1990; Yewdell et al., 1992). In den angesäuerten Endosomen erfolgt der proteolytische Abbau der Proteine. Die dabei entstandenen Fragmente, welche aus mindestens 13 AS bestehen, werden nach Verschmelzung mit einem MHC Klasse II-haltigen Vesikel auf die neu synthetisierten MHC-Moleküle (Germain, 1994) geladen und an die Oberfläche transportiert. Auch hier wird die Komplexstabilisierung durch Kontakte der AS des Peptids mit variablen, allelspezifischen und konservierten Resten der MHC-Bindungsfurche gewährleistet.

4.3. Kreuzpräsentation (Ackerman et al., 2004; Heath et al., 2004)

Neben dem direkten Weg der Antigenprozessierung, der zur Präsentation auf MHC I-Molekülen führt, existiert ein zweiter Mechanismus, über den es bei der Präsentation exogener Antigene durch Zellen ohne kostimulatorischen Fähigkeiten zu einer Aktivierung Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen kommt. 1976 beschrieb Bevan erstmalig, dass auch exogene Antigene auf MHC I-Molekülen präsentiert werden können (Bevan, 1976). Den Vorgang, dass APCs virusinfizierte Zellen phagozytieren und anschließend Virusantigene über die eigenen MHC I-Moleküle CD8⁺ T-Zellen präsentieren nennt man Kreuzpräsentation. Werden nach der Kreuzpräsentation simultan kostimulatorische Signale durch die APC vermittelt, können naive CTLs aktiviert werden, was dann als Kreuzimmunität bezeichnet wird. Bei der alleinigen Kreuzpräsentation ohne Kostimuli, der sog. Kreuztolerisierung kommt es hingegen nicht zur CTL-Aktivierung. Die Aufnahme von Antigenen zur Kreuzpräsentation geschieht analog der bei der Präsentation auf MHC Klasse II. Nach Internalisierung in Phagosomen gelangen die Antigene zur proteolytischen Spaltung durch Proteasomen ins Zytosol. Über den Mechanismus und die Bedingungen, die für die Kreuzpräsentation verantwortlich sind herrscht aktuell noch Unklarheit. So wird die Kopplung von Antigenen an Chaperone als ausschlaggebend für die Bindung an Oberflächenrezeptoren von APCs und deren rezeptorvermittelte Endozytose diskutiert (Brode et al., 2004; Srivastava, 2002). Andere Arbeiten hingegen postulieren die Chaperon-unabhängige Aufnahme exogener Antigene (Norbury et al., 2004; Wolkers et al., 2004). Nach Antigenaufnahme fusionieren die Phagosomen, welche die exogenen Antigene beinhalten mit sich vom ER abspaltenden Vesikeln (Ackerman et al., 2003; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003). Die ER-Vesikel enthalten die neusynthetisierten MHC I-Moleküle sowie die zur Beladung notwendigen Bestandteile wie TAP und Tapasin. Aus diesen fusionierten Vesikeln werden die Antigene wahrscheinlich über einen multimolekularen Kanal ins Zytosol transportiert (Romisch, 1999; Wiertz et al., 1996). Jedoch scheinen auch andere Proteinkanäle an diesem Vorgang beteiligt zu sein (Matlack et al., 1998; van Endert, 1996). Im Zytosol werden die Antigene von Proteasomen degradiert und gelangen über TAP wieder zurück ins Vesikel-Hybrid. Dort binden sie an MHC I-Moleküle und werden an die Zelloberfläche transportiert. Es existieren allerdings auch Hinweise auf eine TAP-unabhängige Translokation von

Antigenen (Norbury et al., 2004; Schoenberger et al., 1998). Das Phänomen der Kreuzpräsentation ist bei den APCs unterschiedlich ausgeprägt: Für Makrophagen konnte eine Kreuzpräsentation gezeigt werden (Bellone et al., 1997), dendritische Zellen besitzen auch die Fähigkeit zur Erzeugung einer Kreuzimmunität (Kurts et al., 2001; Ronchetti et al., 1999) und für B-Zellen ist sowohl in vitro als auch in vivo die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation nachgewiesen (Heit et al., 2004).

5. Generierung MHC-Peptid-spezifischer Reagenzien

Die Herstellung und Charakterisierung peptidspezifischer Antikörper gegen HLA-Moleküle ist für die Forschung, Diagnostik und Therapie von großer Bedeutung. Dank ihrer löslichen Natur, hohen Affinität und Stabilität könnten peptidspezifische Antikörper in verschiedenen biochemischen Verfahren wie der Immunpräzipitation oder der Immunhistochemie eingesetzt werden, um T-Zell-Epitope auf Antigenpräsentierenden Zellen zu detektieren und zu charakterisieren (Chames et al., 2000). In der Therapie könnte mit Hilfe derartiger Antikörper die unerwünschte T-Zell-Immunantwort, die bei Autoimmunität auftritt, blockiert werden (Aharoni et al., 1991). Zudem könnten solche Antikörper, wie unter 3.3.5 bereits erwähnt, Toxine zum Zielort transportieren und dadurch eine selektive Vernichtung von Tumorzellen hervorrufen (Reiter et al., 1997). Tumorspezifische Antikörper können zudem die Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen mittels Aktivierung ihrer Fc-Rezeptoren gezielt herbeiführen. Mittels Radionuklid gekoppelter Antikörper kann man eine lokal hohe Strahlendosis applizieren, die zu einer Abtötung der Zelle führt, an die der Antikörper gebunden hat. Zusätzlich erhalten auch benachbarte Tumorzellen meist eine letale Strahlendosis, selbst wenn der Antikörper nicht an sie bindet. Um Tumoren zu diagnostizieren und das Ausmaß ihrer Ausbreitung besser einschätzen zu können, verwendet man an Isotope gekoppelte Antikörper, die γ -Strahlen aussenden.

Bis heute konnte eine ganze Reihe von monoklonalen Antikörpern hergestellt werden, deren Spezifität gegen MHC Klasse I-Antigene gerichtet ist. Es ist jedoch nur in einigen wenigen Fällen gelungen, Reagenzien herzustellen, die mit einem bestimmten MHC-Molekül peptidspezifisch, d.h. wie T-Zell-Rezeptoren, reagieren (Aharoni et al., 1991; Murphy et al., 1989). Schwierigkeiten lassen sich u.a. auf die unterschiedliche Topologie der Erkennungsbereiche von Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren zurückzuführen. Immunglobuline erkennen in der Regel nach außen gewölbte Moleküloberflächen. Da die Peptide jedoch tief in der Furche eines HLA-Komplexes liegen,

tragen sie wenig zur Antigenerkennung des gesamten HLA-Peptid-Komplexes durch Antikörper bei. Deshalb erkennen Antikörper in erster Linie den HLA-Anteil eines HLA-Peptid-Komplexes. T-Zell-Rezeptoren werden jedoch im Thymus so selektiert, dass sie in der Lage sind, sowohl das HLA-Molekül als auch das gebundene Peptid zu erkennen. Es ist auch zweckmäßig, dass B-Lymphozyten bzw. Antikörper nicht darauf ausgerichtet sind, HLA-Peptid-Komplexe zu erkennen, um T-Zell-Epitope nicht zu blockieren.

6. *Heterologe Expression von Antikörperfragmenten in E. coli*

6.1. Bakterielle Expression löslicher Antikörperfragmente

Es ist relativ einfach und kostengünstig, rekombinante Antikörperfragmente in dem Bakterium *E. coli* herzustellen (Better et al., 1988; Bird et al., 1988; Huston et al., 1988; Pluckthun et al., 1989; Skerra et al., 1988). Eine bakterielle Expression vollständiger Antikörpermoleküle macht jedoch wenig Sinn, da die Effektorfunktion eines Antikörpermoleküls nur dann vermittelt wird, wenn der Fc-Teil des Proteins glykosyliert ist, wozu *E. coli* nicht in der Lage ist. Ein kritischer Punkt bei der Expression von Fab-Fragmenten ist die funktionelle Faltung des Proteins. So ist im reduzierenden Milieu des bakteriellen Zytoplasmas die zur Faltung notwendige Ausbildung von Disulfidbrücken nicht möglich. Aufgrund der Tatsache, dass eine Renaturierung äußerst schwierig, zeitaufwendig und ineffektiv ist und eine zytoplasmatische Expression funktionell gefalteter Antikörperfragmente ausschließlich in Thioredoxin-Synthase defizienten Bakterienstämmen möglich ist (Proba et al., 1995; Whitlow, 1991), bedient man sich einer eleganteren Methode zur Expression funktioneller Fab- oder scFv-Fragmente. Dazu isoliert man die Proteine aus dem bakteriellen Periplasma, einem Raum, der sich bei gramnegativen Bakterien zwischen der inneren und der äußeren Zellmembran befindet. Im Gegensatz zum Zytoplasma existiert in diesem Raum ein Enzymsystem, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken katalysiert (Collet et al., 2002; Kadokura et al., 2003). Mittlerweile hat man im Periplasma sogar Chaperone identifiziert, die eine korrekte Faltung unterstützen (z.B. Skp/OmpH/HlpA (Bothmann et al., 1998)). Damit ein Transport der Antikörperfragmente vom Zytoplasma ins Periplasma stattfinden kann müssen die Proteine mit einem speziellen Signalpeptid fusioniert werden (z.B. *pelB* oder *ompA*). Das Signalpeptid wird bei dem Transport durch die innere Zellmembran abgespalten. Weitere Vorteile der periplas-

matischen Extraktion sind eine geringere Anzahl anderer Proteine, was die Reinigung der so gewonnenen Antikörperfragmente erheblich erleichtert sowie das Vorhandensein von weniger Proteasen als im Zytoplasma, was die Gefahr einer Protein-degradierung vermindert.

6.2. Phage-Display

Das Prinzip einer Phagenbibliothek beruht auf der Imitation von drei grundlegenden Prinzipien des natürlichen Immunsystems: Erstens der Bereitstellung einer Vielfalt an Antikörpergenen (in Form rekombinanter Genbibliotheken), zweitens der effektiven Selektion des korrekten Gens aus dieser Vielfalt (mit Hilfe von Oberflächenexpressionsvektoren) und drittens der Verbesserung von Affinität und Spezifität eines selektierten Antikörperfragments (Marks et al., 1992a). Bei der von George P. Smith entwickelten Phage-Display-Methode (Smith, 1985) werden Polypeptide oder Proteine, in unserem Fall ein Repertoire von Antikörper-Fragmenten (scFv oder Fab), auf der Oberfläche filamentöser Phagen exprimiert, wobei jeder Phagenpartikel ein Antikörperfragment nur einer Spezifität trägt. Beim Verfahren des sog. „Bio-Panning“ kann aus einer solchen Bibliothek ein Phagenpartikel gegen ein spezielles Antigen selektioniert werden. Dafür wird das entsprechende Antigen an eine Matrix gebunden und mit der Phagensuspension inkubiert. Jene Phagen, die das entsprechende Antikörperfragment präsentieren, binden an das fixierte Antigen, während die ungebundenen Phagen im nächsten Waschschrift entfernt werden. Die auf diese Weise angereicherten Phagen werden eluiert um anschließend Bakterien zu infizieren, in denen sie sich vermehren können. Je nach Wahl des Bakterienstammes wird das Stopp-Codon, das sich zwischen dem Antikörperfragment-Gen und dem Gen für das Oberflächenprotein gpIII (minor coat protein) befindet, entweder überlesen (z.B. TG1 oder XL1-Blue), so dass Antikörperfragment-gpIII Fusionsproteine exprimiert werden oder die Translation bricht im Bereich des Stopp-Codons ab und es erfolgt die Expression von löslichen Antikörperfragmenten (Winter et al., 1994). Die Affinitätsreifung der gewonnenen Fragmente, die bei Igs durch somatische Mutationen erfolgt, kann durch Punktmutationen oder den Austausch der Ketten erhöht werden. Bei der Herstellung und Verwendung von Phagenbibliotheken werden zwei technologische Errungenschaften genutzt: die Amplifizierung eines Repertoires von VH- und VL-Genen aus B-Lymphozyten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Larrick et al., 1989; Orlandi

et al., 1989; Ward et al., 1989) und die Möglichkeit, kurze Peptide auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen zu exprimieren (Clackson et al., 1991; Marks et al., 1992b; Smith, 1985). Der Erfolg der Selektion hängt von mehreren Faktoren ab: der Komplexität des Antikörperrepertoires, der Methode der Antikörperexpression auf der Phagenoberfläche, dem Selektionsprozess selbst und den nachfolgenden Tests für die Auslese amplifizierter Fragmente.

Die filamentösen Bakteriophagen M13, fd, f1 und ft, welche bei der Phage-Display-Technologie am häufigsten zum Einsatz kommen sind einzelsträngige DNA-Viren, die eine Vielzahl gramnegativer Bakterien infizieren ohne diese zu lysieren. Das Genom eines filamentösen Phagen besteht aus etwa 6.400 Nukleotiden und kodiert für zehn Proteine. Die Phagenhülle wird aus dem Produkt des Gens VIII (pVIII), das in etwa 3.000 Kopien vertreten ist und aus den Produkten der Gene III (pIII), VI, VII und IX, die jeweils etwa in Form von fünf Proteinen vertreten sind, zusammengesetzt. Das Hauptprotein pVIII ist für die Umhüllung der einzelsträngigen DNA verantwortlich. Das Protein pIII, welches sich auf der Spitze des Phagenpartikels befindet, ist bei der Phage-Display-Methode das am häufigsten genutzte Protein zur Peptidexpression. Dieses Protein besitzt zwei funktionelle Domänen: Eine exponierte N-terminale Domäne welche bei der Infektion des Bakteriums an den F-Pilus der Bakterienmembran andockt und eine C-terminale Domäne, die einen integralen Bestandteil des Capsids darstellt. Weiterhin kann an das N-terminale Ende von pIII ein Peptid fusioniert werden, ohne die Morphogenese und die Infektionsfähigkeit des Phagen zu beeinträchtigen (Parmley et al., 1988). Auf der Phagenoberfläche können auf diese Weise scFv- und Fab-Fragmente exprimiert werden (Hoogenboom et al., 1991; McCafferty et al., 1990). Hierbei tragen pIII-Bibliotheken 3-5 Kopien auf ihrer Oberfläche, pVIII-Bibliotheken bis zu 2.700 Kopien kleiner Peptide.

Für die Expression auf Phagen werden die für Antikörperfragmente kodierenden Gene in-frame vor das Gen III (gIII) in ein chimärisiertes Plasmid, genannt Phagemid, kloniert. Dieses Plasmid enthält sowohl einen Replikationsursprung für Plasmide als auch den Phagen-Replikationsursprung (Breitling et al., 1991; Dubel et al., 1993; McCafferty et al., 1990). Phagemide vermehren sich in einer Wirtszelle wie doppelsträngige Plasmidmoleküle. Werden die Zellen jedoch gleichzeitig mit einem Helferphagen infiziert, so vermehren sich die Phagemide wie ein Einzelstrang-DNA-Bakteriophage. Die DNA eines Helferphagen enthält die genetische Information für

alle Phagenproteine, die für die Verpackung und Sekretion von Phagenpartikeln nötig sind, hat jedoch einen defekten Replikationsursprung, wodurch sie mit einer niedrigeren Effektivität als das für das scFv/pIII-Fusionsprotein kodierende Phagemid repliziert wird. Am Ende entsteht ein infektiöser Phagenpartikel, der sowohl pIII als auch das fusionierte Protein scFv/pIII präsentiert und das für das Fusionsprotein kodierende Phagemid trägt (Abb. 3).

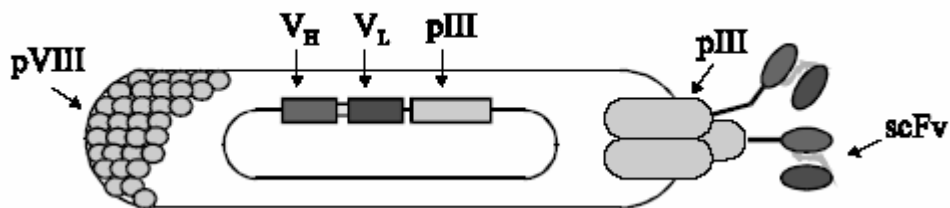


Abb. 3: Schematische Darstellung eines scFv-exprimierenden Phagenpartikels

Manche Phagemide haben ein Amber-Stoppcodon zwischen den Antikörperketten und dem pIII-Gen [pHEN1; (McCafferty et al., 1990)]. Dies erlaubt eine Umschaltung von der Expression des Fusionproteins zur Produktion eines löslichen Antikörperfragments in einem nichtsuppressiven Stamm. Ein Repertoire der V_H- und V_L-Gene kann aus der Population peripherer B-Lymphozyten (PBL) (Ward et al., 1989) isoliert und zur Konstruktion einkettiger variabler Domänen (z. B. Fab-Fragmenten) verwendet werden. Eine zufällige Kombination der schweren und leichten Ketten führt dabei zur Entstehung einer Bibliothek von Antikörper-Fragmenten verschiedener Spezifität (Huse et al., 1989; Marks et al., 1992b). Die Expression der Bibliothek auf der Oberfläche von Phagen bietet die Möglichkeit, mit Selektionstechniken Reagenzien zu erzeugen, die prinzipiell jedes beliebige Antigen erkennen können.

7. Immuntherapeutischer Ansatz zur Behandlung maligner Erkrankungen

7.1. Tumorantigene

Tumorzellen exprimieren zelleigene Proteine, die nach MHC I-Präsentation von körpereigenen CTLs erkannt und lysiert werden können. Jene Antigene werden als tumorassoziierte Antigene (TAA), Tumorabstoßungsantigene (TRA = tumor rejection antigens) oder einfach Tumorantigene bezeichnet. Tumorantigene, welche von CTLs

erkannt werden, lassen sich in zehn Gruppen untergliedern (Jager et al., 2002; Preuss et al., 2002):

Antigene, die im gesunden Gewebe lediglich im Hoden oder der Plazenta, also in zwei immunologisch privilegierten Organen, vorkommen, jedoch in vielen Tumoren reaktiviert werden können, bilden als sog. „**Cancer/Testis-Antigene**“ (**CTA**) oder nach ihrem Expressionsmuster korrekter als **Cancer/Germline Antigene (CGA)** bezeichnet die erste Gruppe. Diese Antigene kommen in einer Vielzahl von Tumoren vor und werden auch als „**shared tumor antigens**“ bezeichnet. Beispiele sind NY-ESO-1 (Jager et al., 1998), LAGE-1 (Lethe et al., 1998), die MAGE- (Gaugler et al., 1996; van der Bruggen et al., 1991), GAGE- (Van den Eynde et al., 1995), BAGE-Familie (Boel et al., 1995; Boon et al., 1994; Van Pel et al., 1995) und das hier näher untersuchte SSX2 (Sahin et al., 1995). Während die meisten CT-Antigene auf dem X-Chromosom kodiert sind (z.B. MAGE, GAGE, SSX, NY-ESO-1, LAGE-1, CT7, CT10, CTp11, SAGE) (Old, 2001) werden immer mehr CTA's gefunden, deren Gene auf anderen Chromosomen lokalisiert sind. SCP-1 und CT9 sind beispielsweise auf Chromosom 1 lokalisiert (Meuwissen et al., 1997; Scanlan et al., 2000), cTAGE-1 auf Chromosom 18 (Eichmüller et al., 2001). Die Rolle der meisten CT-Antigene ist noch unbekannt, jedoch wird ihnen eine regulatorische Funktion bei der Genexpression zugeschrieben (Caballero et al., 2009; Kalejs et al., 2005; Simpson et al., 2005).

Die zweite Kategorie besteht aus den sog. **Differenzierungsantigenen**, wie etwa Tyrosinase, gp75, gp100 oder Melan A/MART1, die nur in Melanozyten und Melanomen exprimiert werden. Vor einiger Zeit wurde mit RU2 auch ein Differenzierungsantigen für die Niere beschrieben (Van Den Eynde et al., 1999).

Die dritte Klasse, sog. **Mutationsantigene**, stellen das ideale Target für therapeutische Ansätze dar, da sie ausschließlich vom Tumor präsentiert werden (Gilboa, 1999). Es handelt sich entweder um Peptide, die durch somatische Mutationen entstanden sind und somit patientenspezifisch sind oder um Antigene, die durch Punktmutationen aus ubiquitär exprimierten Peptiden entstanden sind (Van den Eynde et al., 1997a).

Die vierte Gruppe bilden die **onkoviralen Antigene**. Hierzu zählen virale Antigene, die in Malignomen mit viraler Ätiologie vorkommen (u.a. Burkitt-Lymphom, HBV-/HCV-induziertes HCC, HPV-induziertes Zervixkarzinom).

Zur fünften Gruppe gehören in Malignomen **überexprimierte Antigene**, welche auch gleichzeitig im gesunden Gewebe vorkommen (Fenton et al., 1997). Hierzu zählen z.B. HER-2/neu (Fisk et al., 1995), MUC1 (Brossart et al., 1999; Brossart et al., 2001) einschließlich des Protoonkogen c-Met.

Zudem können Tumorantigene durch **amplifizierte Gene** kodiert werden. Die Überexpression eines Transkripts, welche aus einer Genamplifikation resultierte, konnte für den translationsinitiiierenden Faktor eIF-4 γ in einem Plattenepithelkarzinom der Lunge nachgewiesen werden (Brass et al., 1997).

Eine weitere Klasse von Tumorantigenen sind **Spleißvarianten**, die durch bekannte Gene kodiert werden und eine immunogene Wirkung bei Tumorpatienten entfalten. Beispiele sind NY-COL-38 und Restin (Spleißvariante von CLIP-170).

Weiterhin unterscheidet man **tumorassoziierte Autoantigene** z.B. HOM-MEL-2.4 (Tureci et al., 1997) und **nicht tumorassoziierte Autoantigene**, zu denen z.B. HOM-RCC-10 und HOM-TES-11 (PCM-1) zählen (Balczon et al., 1994; Baum, 1995; Sahin et al., 1997). Beide werden sowohl im gesunden als auch im malignen Gewebe auf gleichem Niveau exprimiert; im Gegensatz zu den tumorassoziierten Autoantigenen findet man bei nicht tumorassoziierten Autoantigenen Antikörper gegen diese Antigene nicht nur bei Tumorpatienten sondern auch bei Gesunden.

Die letzte Gruppe besteht aus **unterexprimierten Genen**. So wurde beispielsweise für das Antigen HOM-HCC-8 in hepatozellulären Karzinomen eine im Vergleich zum normalen Gewebe deutlich geringere Expression nachgewiesen (Stenner-Liewen et al., 2000).

7.2. Tumorescape-Mechanismen

Tumorzellen besitzen potente Strategien sich trotz ihrer prinzipiellen Immunogenität der Zerstörung durch das körpereigene Immunsystem zu entziehen. Diese Tatsache erkennt man daran, dass eine spontane Regredienz eines bereits etablierten Tumors nur selten zustande kommt, was schließlich zur Persistenz und Progredienz der Erkrankung führt. Auf Grund des Selektionsdruckes kommt es zu einer Veränderung der Tumorzelle in der Art, dass eine effiziente Vernichtung nicht mehr stattfinden kann (Anichini et al., 1999; Costello et al., 1999; Espinoza-Delgado, 2002; Gouttefangeas et al., 2000). Eine Strategie ist, dass die Zelle ein TAA nicht mehr oder nur unzureichend präsentiert. So können Tumorzellen ihre MHC I-Moleküle herunter re-

gulieren (Costello et al., 1999; Gilboa, 2001) und eine Präsentation des TAA's aufgrund einer TAP- oder Proteasom-Defizienz verhindern (Ferrone et al., 1995; Seliger et al., 1997). Weiterhin kann es zu einer Hemmung kostimulierender Moleküle wie CD28, B7 oder CD40 kommen, so dass das entscheidende zweite Signal der T-Zell-Aktivierung fehlt, oder es findet eine Präsentation T-Zell-inhibierender Moleküle statt, zu denen beispielsweise CTLA-4 zählt (Alexandroff et al., 2000; Chambers et al., 2001). Zudem fehlt oft eine Entzündungsreaktion, wie man sie bei bakteriellen oder viralen Infektionen vorfindet, was wiederum eine fehlende Bildung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine nach sich zieht. Konsekutiv werden weder eine Expression von Adhäsionsmolekülen angeregt, noch professionelle APCs angelockt und zur Reifung angeregt, so dass naive T-Zellen letztendlich nicht einwandern bzw. aktiviert werden können (Fenton et al., 1997; Piali et al., 1995). Einen anderen entscheidenden Faktor stellt die Tatsache dar, dass manche Tumore die Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 blockieren und die Signaltransduktion auf T-Zellen verhindern können (Rayman et al., 2000). Zudem sind Tumorzellen in der Lage, immunsuppressive Faktoren wie TGF- β , Prostaglandine oder IL-10 zu bilden, was eine Hemmung der Reifung, Proliferation und Funktion von APCs und T-Zellen zur Folge hat und somit zu einer Modifikation des gesamten Immunsystems führt (Gabrilovich et al., 1996; Gilboa, 2001; Kim et al., 1995; Radoja et al., 2000; Restifo, 2000). Ein weiterer Mechanismus besteht darin, dass Antikörper, welche gegen das Oberflächenantigen der Tumorzelle gerichtet sind, die Endozytose und den Abbau des Antigens auslösen können. Manche Malignome weisen auch einfach keine dem Immunsystem unbekannten Peptide auf der Oberfläche auf, so dass die Zellen dem Immunsystem als „normal“ erscheinen.

7.3. Die SSX-Familie und das CTA HOM-MEL-40/SSX2

HOM-MEL-40, auch SSX2 genannt, war das erste SEREX-definierte CT-Antigen, das im Rahmen des Screenings einer Melanombank identifiziert wurde (Sahin et al., 1995; Tureci et al., 1996). SEREX, die **ser**ologische Analyse von Antigenen durch **rek**ombinante **Exp**ressionsklonierung, basiert auf dem Screening von Tumor-cDNA-Expressionsbanken mit Seren von autologen (und allogenen) Tumorpatienten. Die Verwendung polyklonaler Patientenserum eröffnet hierbei die Möglichkeit, bei einem Screening-Durchgang gleich mehrere Antigene zu identifizieren. Da sowohl das

exprimierte antigene Protein als auch die kodierende cDNA im selben Plaque des Phagenimmunoscreening-Assays vorhanden sind, kann das identifizierte Antigen im Anschluss sequenziert und molekularbiologisch charakterisiert werden. Aus diesem Grund leitet sich der Name HOM-MEL-40 vom Homburg-Melanom-Klon 40 ab. Im Rahmen weiterer Untersuchungen stellte sich heraus, dass besagtes Antigen vom SSX2-Gen kodiert wird, welches erstmalig beim humanen Synovialsarkom, einem aggressiven Weichteilsarkom, der im jungen Erwachsenenalter auftritt, mit t(X;18) Translokation beschrieben wurde (Clark et al., 1994). Somit leitet sich auch der Name SSX2, was für **S**ynovial **S**arcoma, **X** breakpoint **2** steht, von seiner Lokalisation auf dem X-Chromosom ab. Dabei exprimieren Synovialsarkome, die in mehr als 70 Prozent die t(X;18)(p11.2;q11.2) Translokation besitzen, chimäre Transkripte, in denen 3'-Sequenzen von SSX1, SSX2 oder SSX4 mit 5'-Sequenzen von SYT fusionieren, das auf Chromosom 18 lokalisiert ist (Brodin et al., 2001; Crew et al., 1995; Geurts van Kessel et al., 1997). SSX2 ist ein Mitglied der SSX-Multi-Gen-Familie, die aus 9 Genen besteht, welche alle auf dem X-Chromosom lokalisiert sind und deren Genprodukte eine Homologie zwischen 77 und 91% aufweisen (Gure et al., 1997; Gure et al., 2002). Expressionsanalysen zeigten, dass Transkripte mindestens eines Mitglieds der SSX-Familie in etwa 57% der Kopf- und Halstumoren, 43% der Melanome, 27% der Colonkarzinome, 50% der Ovarialkarzinome (ausschließlich SSX4-Expression), 40% der Prostatakarzinome, 23% der Mammakarzinome sowie 36% der Non-Hodgkin Lymphome (nur SSX2-Expression) nachweisbar waren (Tureci et al., 1998), jedoch nicht im gesunden Gewebe mit Ausnahme von Testis und in extrem geringen Mengen in der Schilddrüse. Zudem demonstrierten frühere Arbeiten, dass das SSX2-Protein immunogen ist und sowohl eine CTL-Antwort (Ayyoub et al., 2002; Wagner et al., 2003) als auch eine humorale Antwort in Form einer Antikörperproduktion induzieren kann (Tureci et al., 1998). Es ist bekannt, dass SSX1, 2, 4 und 5 in einer Reihe von Tumoren und im Testisgewebe exprimiert werden. SSX3 und SSX7 werden zwar im Testisgewebe exprimiert, jedoch extrem selten in Tumorzelllinien. Die Expression von SSX6, 8 und 9 konnte hingegen in keinem normalen Gewebe nachgewiesen werden. Jedoch wurde eine SSX 6-Expression in einer Melanomzelllinie gefunden. Zudem lässt sich die Expression von SSX1, 2, 4, 5 und 6 durch eine Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin oder Trichostatin A in Tumorzellen induzieren, wohingegen dies bei SSX3, 7, 8 und 9 nicht möglich ist (Gure et al., 2002). Diese

Tatsache zeigt, dass die SSX-Promotoraktivität sensitiv ist für Methylierungen, wie dies auch bei den MAGE-Genen vorbeschrieben ist (De Smet et al., 1999). Folglich wäre es interessant, die Effektivität von 5-DC als Coadjuvans zu einer SSX-Vakzinierung zu untersuchen, besonders in Anbetracht der Tatsache, dass es das Tumorwachstum inhibiert, Differenzierung induziert und zu einer Upregulation von HLA Klasse I-Molekülen führt (dos Santos et al., 2000). Die SSX-Genprodukte fungieren am ehesten als Transkriptionsrepressoren (Lim et al., 1998).

Des Weiteren zeigt sich eine sehr heterogene Expression bei der Detektion mit einem murinen monoklonalen Anti-SSX-Antikörpers (E3AS), welcher die Proteine SSX2, 3 und 4 erkennt. So finden sich in der Mehrzahl der Tumoren keine oder nur wenige SSX2-positive Zellen und große SSX2-negative Regionen. Jedoch gibt es extreme Variationen was die Anzahl SSX2-positiver Zellen betrifft (dos Santos et al., 2000; Geurts van Kessel et al., 1997). Ebenso variiert der Prozentsatz SSX2-positiver Zellen beträchtlich bei den verschiedenen Zelllinien. Dieser Sachverhalt wirft die Frage auf, ob alle SSX2-positiven Tumoren in gleichem Maße einer Immuntherapie zugänglich sind.

8. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Vorarbeit und Grundlage der vorliegenden Arbeit ist die Selektion, Generierung und Charakterisierung MHC-Peptid-spezifischer Fab-Antikörper, die von HLA-A*0201 präsentierte immunogene Peptidfragmente von SSX2 erkennen. Ziel war es, mit den so hergestellten Fabs Untersuchungen zur Präsentation der beiden Epitope SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 und SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 durchzuführen.

Hierzu soll im ersten Teil der Doktorarbeit gezeigt werden, dass die Fabs peptidspezifisch, wie ein T-Zell-Rezeptor mit dem MHC-Komplex interagieren. Dies geschah, indem ihre spezifische Reaktivität sowohl in der ELISA (gegen ein Panel rekombinanter MHC-Peptid-Komplexe) als auch in der Durchflusszytometrie (gegen exogen mit Peptid beladene Zellen) getestet wurde. Zudem sollte der Nachweis einer allelspezifischen Interaktion geführt werden und überprüft werden, ob die Fab-Antikörper dazu in der Lage sind, epitopspezifische CTLs zu inhibieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Bindungsmodus der Fab-Antikörper untersucht. Im Speziellen sollte die Frage beantwortet werden, ob die MHC-Peptid-Fab-Interaktion ebenso konserviert wie die MHC-Peptid-T-Zell-Rezeptor-Interaktion ist.

Dies wurde realisiert, indem das Bindungsverhalten gegenüber verschiedenen Aminosäuresubstitutionen des Peptidfragements SSX2₄₁₋₄₉ und SSX2₁₀₃₋₁₁₁ und nach Mutagenisierung der HLA-A*0201-Schwerkette analysiert wurde.

Weiterhin erfolgten mit den beiden besten Bindern gegen die Epitope SSX2₄₁₋₄₉ und SSX2₁₀₃₋₁₁₁ Sensitivitätsanalysen. Diese zielten darauf ab, sicherzustellen, dass beide Fab-Antikörper das Antigen mit gleich hoher Sensitivität detektieren.

In erster Linie sollte nach all diesen Untersuchungen der Versuch einer validen Detektion des MHC-Peptidkomplexes nach endogener Prozessierung auf Tumorzellen unternommen werden. Hierbei sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden: Haben die Behandlungen mit IFN- γ oder 5-Aza-2'-deoxycytidin einen Einfluss auf die Präsentation der beiden Peptidepitope SSX2₄₁₋₄₉ und SSX2₁₀₃₋₁₁₁? Existiert eine simultane Expression der beiden Epitope des CT-Antigens SSX2 im Kontext von HLA-A*0201?

Material und Methoden

1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Angaben zu den verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1 M Salzsäure	Merck
1 M Schwefelsäure	Merck
Acrylamid Mix	Roth
Agar, granulated	Difco™
Agarose	Biozym
Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit	Biorad
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Ratio
AmpliTaq Gold	Applied Biosystems
Biotin	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck
Bromphenolblau	Merck
Chloramphenicol	Roche
Coomassie Brilliant Blue G250	BIO-RAD
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
DMEM, high Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamin	PAA
DMEM, low Glucose (1 g/l) with L-Glutamin	PAA
DNA-Primer BACK primer pUC reverse (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3') FORWARD primer fd-tet-seq-24 (5'-TTTGTCTCGTCTTTCCAGACGTTAGT-3')	MWG AG Biotech
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, ohne Kalzium und Magnesium (PBS)	PAA
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Dynal Biotech
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck
Ethanolaminhydrochlorid	Amine Coupling Kit, Biacore AB
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder	Fermentas
GFP (recombinant)	G. Schlenstedt, Biochemie, Uniklinikum des Saarlandes, Homburg
Glucose 40%	Deltaselect
Glycerol	Merck
Glycin	Merck
HBS-EP Puffer (HEPES-Puffer)	Biacore AB

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Imidazol (zur Synthese)	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Sigma
L-Glutamin	PAA
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver (Marvel)	Hochwald-Nahrungsmittelwerke GmbH
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethan (TEMED)	Roth
Nanofectin Transfection Kit	PAA
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	Roth
Natriumhydroxid	Merck
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Amine Coupling Kit, Biacore AB
Orange G	Merck
P1 Puffer	Fermentas

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas
Penicillin	Roche
Penicillin/Streptomycin	PAA
Ponceau S pure	Serva
Polyethylenglykol 6000 (PEG)	Sigma-Aldrich
Proteinase Inhibitor Cocktail Tablets Complete™ EDTA-free	Roche Diagnostics
Restriktionsenzyme BstN-1, NotI und EcoRI	Fermentas
Restriktionspuffer NEB2 und NEB3	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RPMI 1640 Kulturmedium	PAA
Sensor Chip CM5, Research Grade	Biacore AB
Streptavidin Coated Microspheres (Beads)	Bangs Laboratories, Inc.
Streptavidin	Gibco
Streptavidin-AP Conjugat	Roche
Streptomycin	Roche
Sucrose	Sigma
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen
Synthetische DNA, Primer	MWG AG Biotech

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics
Talon™ Metal Affinity Resin	Clontech Laboratories, Inc.
Taq-Polymerase	Fermentas
Taq-Reaktionspuffer	Fermentas
TMP Microwell Peroxidase Substrat System	Kirkegaard & Perry Lab.
Triethylamin (TEA)	Merck
Tris	Roth
Tris Hydrochlorid (TrisHCl)	Roth
Tris Hydroxymethylaminomethan (Tris Base)	Merck
Trypanblaulösung	Sigma
Trypsin/EDTA	PAA
Trypton	Becton, Dickinson and Company Bacto™
Tween 20	Caesar und Lorenz GmbH
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (ECL)	Perkin Elmer LAS, Inc.
X-VIVO 15	Biowhittaker
Yeast-Extract	Becton, Dickinson and Company Bacto™
β-Mercaptoethanol	Merck

2. Peptide, Antikörper und Färbereagenzien

Die Peptidsynthese erfolgte in folgendem Institut:

NMI Technologietransfer GmbH, Markwiesenstr. 55, D-72770 Reutlingen

Tab. 2: Verzeichnis der Peptidepitope mit Angabe der Aminosäuresequenz und des SYFPEITHI-Scores (Rammensee et al., 1999)

Peptid	Position	AS-Sequenz	SYFPEITHI-Score HLA-A*0201
SSX1	103-111	RLHRIIPKI	25
SSX2	103-111	RLQGI \underline{S} PKI	23
SSX3=SSX5 =SSX9	103-111	RLQGI \underline{E} PKI	23
SSX4	103-111	SLQRI \underline{E} PKI	23
SSX4 (AS)	103-111	SLQRI \underline{E} PKD	15
SSX6=SSX8	103-111	RLQRIIPKI	25
SSX7	103-111	RLQRI \underline{E} PKI	21
SSX1=SSX8	41-49	KYSEK \underline{I} SYV	18
SSX2	41-49	KASEK \underline{I} FYV	22
SSX3	41-49	KVSEK \underline{I} VYV	24
SSX4	41-49	KSSEK \underline{I} VYV	20
SSX5	41-49	KASEK \underline{I} IYV	22
SSX6	41-49	KFSEK \underline{I} SCV	18
SSX7	41-49	KSLEK \underline{I} SYV	20

Peptid	Position	AS-Sequenz	SYFPEITHI-Score HLA-A*0201
SSX9	41-49	KSSEK I YV	18
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ R103A	103-111	A LQGI S PKI	25
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ L104A	103-111	R A QGI S PKI	17
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ Q105A	103-111	RL A GI S PKI	25
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ G106A	103-111	RLQ A I S PKI	21
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ I107A	103-111	RLQG A S PKI	23
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ S108A	103-111	RLQGI A PKI	23
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ P109A	103-111	RLQGI S A KI	24
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ K110A	103-111	RLQGI S P A I	22
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ I111A	103-111	RLQGI S PK A	19
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ Q105E	103-111	RL E GI S PKI	22
CMV pp65	495-503	NLVPM V ATV	30
Melan A	27-35	AAGIGILTV	-
Melan A A27L	26-35	ELAGIG I LTV	15
NY-ESO1	157-165	SLLMW I TQC	18
gp100	209-217	IMDQVP F SV	22
G250	421-429	GLLFA V TSV	28

Anmerkung: Ankerpositionen (anchors) (fett gedruckte Buchstaben)

Hilfsankerposition (auxiliary anchors) (unterstrichen)

Tab. 3: Angaben zu den verwendeten Antikörpern und Färbereagenzien

Antikörper und Färbereagenzien	Hersteller
Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (BCIP+NBT)	BIO-RAD
Anti-c-myc, Klon 9E10 (Konz.: 680 µg/ml)	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Anti-HLA-A*0201, Klon BB7.2 (Hybridomüberstand)	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Anti-HLA-A2, Klon Tü 155	Zur Verfügung gestellt von Prof. Andreas Ziegler, Berlin
Anti-M13	GE Healthcare
Anti-Streptavidin-Phage, Klon F2 (coating control)	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat anti-Human IgG	Dako
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat anti-Mouse IgG (H+L) [anti-Maus-Biotin]	Dako
CD28 Biotin-conjugated mouse Anti-human monoclonal antibody	BD Pharmingen™
E3AS mAb	Zur Verfügung gestellt von Diederik de Bruijn, University Medical Center Nijmegen
Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	BIO-RAD
Helfer-Phage M13-K07	GE Healthcare
HRP-conjugated Streptavidin	Sigma Aldrich
Mouse-anti-human IFNγ-Antikörper, Klon Mab1-D1K	Mabtech
Mouse-anti-human IFNγ-Antikörper, Klon Mab7-B6-1-Biotin	Mabtech
Penta-His Antibody, BSA-free	Qiagen
Poyclonal Rabbit anti-mouse Immunoglobulins/HRP	Dako Cytomotation
R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin [Streptavidin-PE]	Dako Cytomotation

Antikörper und Färbereagenzien	Hersteller
Streptavidin-AP Konjugat	Roche Diagnostics
W6/32, anti-human HLA-ABC Klasse I Schwerkette/ β 2m-Antikörper	Dako

3. Geräte und Software

Durchflusszytometrie:

- Durchflusszytometer: FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg
FACSCanto™ flow cytometer, BD Bioscience
- Cellquest, Software für FACS-Analysen, Becton Dickinson Heidelberg
- WinMDI, Microsoft-kompatible Software zum Auswerten der FACS-Analysen

PCR:

- PCR-Maschine: PTC-200, Peltier Thermal Cycler, Biozym/MJ Research

Vermessung von DNA/RNA:

- Gene Quant pro, Amersham Bioscience

ELISPOT:

- ELISPOT-Platten: Nitrozellulose beschichtete 96-well Platte MultiScreen-HA MAHAN 45, Millipore, Bedford, MA
- BIOREADER®-3000 Pro, BIOPHYS®, Karben

ELISA:

- Immuno 96 MicroWell™ Plates, MaxiSorp, Nunc™
- Fluorometer: Wallac Victor 2 (1420 Multichannel Counter), Pekin Elmer, Freiburg

Fluoreszenzmikroskopie:

- Mikroskop: Invertiertes Fluoreszenzmikroskop, TE2000, Nikon
- Objektiv: Plan Fluor 40x, 1,3 Oil, Nikon
Plan Apo 100x, 1,4 Oil, Nikon
- Lichtquelle: Polychrome IV Monochromator, TILL Photonics
- Filter: TRITC, Ex 540/25, DM 565, BA 605/55
FITC, Ex 480/30, DM 505, BA 535/40
- Kamera: EM-CCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) Kamera, iXon DV887, Andor

- Software: TILL Vision 4.01, TILL Photonics
- ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) zur Bildbearbeitung, National Institutes of Health

Oberflächenplasmonresonanz:

- Biacore® 3000
- Sensor Chip CM5, GE Healthcare, Biacore®
- Software: BIACORE X Control Software
- Software zum Auswerten der Daten: BIAevaluation 3.1, SigmaPlot 2001

4. Puffer und Lösungen**1 M Imidazol:**

- 34 g Imidazol
- mit PBS pH8 auf 1 Liter auffüllen
- für Elution der Fab-Antikörper mit PBS pH 8 auf 100 mM verdünnen

1x PBS:

- 1,42 g Na_2HPO_4
- 0,22 g KH_2PO_4
- 8,75 g NaCl
- mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 Liter auffüllen (pH 7,4-7,6)

TENS-Puffer:

- 10 mM Tris
- 0,1 M NaOH
- 0,5 % SDS
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

10x Lämmli-Laufpuffer:

- 144 g Glycin
- 30,34 g Tris Base
- 10 g SDS
- mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 Liter auffüllen (pH 8,3)

10x Transferpuffer für Westernblot:

- 30 g Tris Base
- 144 g Glycin

- mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 Liter auffüllen
- für Westernblot: 1x Puffer mit 20% Methanol verwenden

12% SDS-Polyacrylamid-Gel (Ansatz für 10 ml):

- 3,3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
- 4 ml 30% Acrylamid-Mix
- 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 0,1 ml 10% SDS
- 0,1 ml 10% APS
- 0,004 ml TEMED

Stack-Gel für Gelelektrophorese (Ansatz für 2 ml) :

- 1,4 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
- 0,33 ml 30% Acrylamid-Mix
- 0,25 ml 1 M Tris (pH 6,8)
- 0,02 ml 10% SDS
- 0,02 ml 10% APS
- 0,002 ml TEMED

5x SDS-Ladepuffer:

- 0,6 ml 1 M Tris pH 6,8
- 3 ml 85% Glycerol
- 2 ml 10% SDS
- 10 mg Bromphenolblau
- 4,4 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
- für **reduzierenden** Laufpuffer: Zugabe von 5% β -Mercaptoethanol

Coomassie-Färbelösung:

- 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R250
- 400 ml Methanol
- 100 ml Essigsäure
- 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Coomassie-Entfärber:

- 400 ml Ethanol
- 100 ml Eisessig
- 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

3%iges Agarose-Gel:

- 3 g Agarose
- 100 ml 1x TAE
- Suspension aufkochen
- nach Abkühlen auf ca. 60°C Zugabe von 100 µl Ethidiumbromid (Konzentration 0,5 µg/ml)

Ethidiumbromid:

- Stammlösung mit 10 mg/ml verdünnen mit H₂O_{dest} auf 0,5 mg/ml
- für Agarose-Gele 1:1000 verdünnen

Ladepuffer für Agarosegele:

- 0,25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylenxyanol FF
- 0,25% Orange G
- 1 mM EDTA
- 40% Sucrose

50x TAE-Stammlösung:

- 242 g TrisBase
- 57,1 ml Eisessig
- 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- mit H₂O_{dest} auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren

2xTY-Medium:

- 16 g Trypton
- 10 g Yeast-Extrakt
- 5 g NaCl
- mit H₂O_{dest} auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren
- für **2 x TY-AG**: nach Autoklavieren in abgekühltes Medium 2% Glucose sowie 100 µg/ml Ampicillin zugeben
- für **2 x TY-AK**: nach Autoklavieren in abgekühltes Medium 100 µg/ml Ampicillin sowie 25 µg/ml Kanamycin zugeben
- für die Produktion biotinylierter Fab-Antikörper in 2 x TY-AG zusätzlich noch 100 µg/ml Chloramphenicol zugeben

2xTY-Agar:

- 16 g Trypton
- 10 g Yeast-Extrakt
- 5 g NaCl
- 15 g Agar
- mit H₂O_{dest} auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren
- nach Abkühlen 2% Glucose sowie 100 µg/ml Ampicillin zugeben und in Petri-schalen gießen

LB-Medium:

- 10 g Trypton
- 5 g Yeast-Extrakt
- 10 g NaCl
- mit H₂O_{dest} auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren

SOC-Medium:

- 2% Trypton
- 1% Yeast-Extract
- 0,1% NaCl
- 250 mM KCl
- mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und anschließend autoklavieren
- Zugabe von 10 mM MgCl₂ (steril) und 20 mM Glucose (steril)

TS-Puffer:

- 12,115 g 0,2 M Tris
- 85,6 g Sucrose
- mit H₂O_{dest} auf 500 ml auffüllen und auf pH 8,0 einstellen
- für **TS/EDTA-free Proteinaseinhibitor-Cocktail**: 1 Proteinase Inhibitor Cock-tail Tablette pro 50 ml H₂O_{des} auflösen

PEG/NaCl:

- 20% Polyethylenglycol 6000 (PEG)
- 2,5M NaCl

5. Zellkultur

5.1. Kulturbedingungen

Die zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte inkubiert.

Die adhärenenten Melanomzelllinien Me290, Me260, Me275 und SK-Mel-37 sowie die Mammakarzinomlinien BT 549, MCF7, T47D und die Suspensionszelllinien T2 und EBV-transformierte LCLs wurden in RPMI 1640 kultiviert, komplettiert mit 10% FCS und 2 mM L-Glutamin. Die Mausfibroblastenlinie 3T3 wurde in DMEM High Glucose, ergänzt mit 10% FCS und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Die Zellen wurden je nach Bedarf im Verhältnis 1:2-1:15 gesplittet wenn sie mit ca. 80% subkonfluent waren.

5.2. Ablösen adhärenenter Zellen

Adhärenent wachsende Zelllinien wurden in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten, indem das Medium 1-3 Mal wöchentlich gewechselt wurde und die Zellen mittels PBS/2 mM EDTA von ihrer Unterlage abgelöst wurden, sobald sie subkonfluent waren. Hierzu wurde das verbrauchte Medium abgekippt und die verbleibenden Zellen mit 5-10 ml PBS/2 mM EDTA überschichtet und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden anschließend 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und entsprechend seinem Verwendungszweck weiterbehandelt.

5.3. Einfrieren vitaler Zellen

Um Zellen für längere Zeit zu lagern, wurden sie geerntet und 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml in 1,8 ml Kryogefäße aliquotiert. Das Einfriermedium setzte sich aus 80% RPMI 1640, 10% FCS und 10% DMSO zusammen. Pro ml wurden etwa 5×10^6 Zellen eingefroren. Die Kryogefäße wurden in vorgekühlte (4°C) Einfrierboxen gestellt und mindestens 4 h bei -70°C eingefroren. Die mit Isopropanol gefüllten Boxen ermöglichen ein kontinuierliches Abkühlen der Probe von ca. 1°C/min. Danach konnten die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

5.4. Auftauen vital eingefrorener Zellen

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 50 ml Medium gewaschen und 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Hierzu wurde das entsprechende Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 2mM L-Glutamin) stets auf 37°C vorgewärmt. Der Überstand wurde abgekippt, die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät.

5.5. Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Tab. 4: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Gewebe	HLA-A2	SSX2	CT-Antigene/ Onkogene	Weitere Besonderheiten
SK-Mel-37	Melanom	+	+	SCP1, BAGE MAGE 1-4, NY-ESO1, TRP2	p53 R175H, CDK4 R24H
Me260	Melanom	-	+	Melan A	
Me290	Melanom	+	+	SCP1	
Me275	Melanom	+	+	NY-ESO1, Melan A, MAGE- A10	
MCF7	Mamma-Ca	+	-	Wnt7h	Östrogenrez.- pos., Sekretion von IGFBP
BT 549	Mamma-Ca	+	-		p53- Punktmutation
T47D	Mamma-Ca			wnt7B, wnt7h, wnt3	p53-Punktmu- tation, hy- potriploid
3T3	Mausfibro- blasten	-	-	-	-
EBV-LCL	Lymphoblas- toide Zellli- nie	Abhängig vom HLA- Status des Spenders			EBV- transfromiert

Zelllinie	Gewebe	HLA-A2	SSX2	CT-Antigene/ Onkogene	Weitere Besonderheiten
T2-Zellen	T/B-hybride, lymphoblas- toide Linie	+	-	-	TAP-defizient

Die Zelllinien wurden freundlicherweise von folgenden Personen bzw. Instituten zur Verfügung gestellt:

- **SK-Mel-37:** Elisabeth Stockert, Ludwig Institute for Cancer Research, New York
- **BT 549, T47D:** Dr. Brigitte Gückel, Frauenklinik Tübingen
- **Me 260, Me 290, Me 275:** Prof. J. C. Cerottini, Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne, Schweiz
- **T2-Zellen:** Prof. Dr. Stefan Stevanovic, Institut für Immunologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- **EBV-LCL:** Dr. Frank Neumann, Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum des Saarlandes (die Zelllinien entstammen verschiedenen Spendern)
- **3T3 MEFs WT:** ATCC, CRL-2752, LGC Standards GmbH
- **MCF7:** Prof. Dr. Stefan Stevanovic, Institut für Immunologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

5.6. Vitalitätstest: Farbausschluss mittels Trypanblau

Das Prinzip beruht darauf, dass lebende Zellen in der Lage sind, Farbstoffe wie Trypanblau für eine festgelegte Inkubationszeit aus der Zelle auszuschließen. Tote Zellen dagegen nehmen den Farbstoff ins Zellinnere auf und färben sich folglich blau an, wohingegen lebende Zellen farblos bleiben.

Durchführung:

Die Zellen wurden mit 0,4%iger Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 gemischt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

6. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Bei der Agarosegelelektrophorese wandern größenabhängig negativ geladene Nukleinsäurefragmente unterschiedlich weit im elektrischen Feld.

Diese Fragmente können mittels Ethidiumbromid (auch als Ethidium oder Homidium bekannt) visualisiert werden. Ethidiumbromid, ein roter Phenanthridin-Farbstoff, bindet an Nukleinsäuren durch Interkalation mit den Basen der DNA bzw. RNA (drei Moleküle je zehn Basen) und verändert dabei sein Absorptionsspektrum bei nahezu unverändertem Emissionsspektrum von 590 nm. Dadurch wird die Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht (302 nm) um den Faktor 50-100 erhöht. Es leuchten somit auf dem UV-Kasten die Stellen im Agarosegel, an denen sich Nukleinsäuren oder -fragmente befinden, hell auf, während das restliche Gel dunkel erscheint. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden Nukleinsäurekonzentration sowie zu deren Länge. Bei Arbeiten mit Ethidiumbromid gilt es jedoch zu beachten, dass diese Substanz 2005 von der Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe als krebverdächtiger Arbeitsstoff der Kanzerogenitätskategorie 3B zugeordnet wurde.

Agarose stellt die Hauptkomponente der Gele dar und kommt in vivo in Rotalgen vor. Es handelt sich dabei um ein Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose, welche glykosidisch miteinander verbunden sind. Agarose besitzt eine starke Tendenz zur Gelbildung und ist somit für die Gelierfähigkeit der Gele verantwortlich. Die Konzentration der Agarose in der Pufferlösung richtet sich nach der Größe der mit der Gelelektrophorese aufzutrennenden Teilchen. Es gilt dabei allgemein: Je kleiner die aufzutrennenden Teilchen, desto höher sollte die Konzentration an Agarose gewählt werden, um eine optimale Auftrennung zu erzielen; für große Teilchen gilt analog das Gegenteil.

Für DNA-Gele wurde ein 3%iges Agarosegel nach Abkühlung und Zugabe des Ethidiumbromids in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Als Elektrophoresepuffer diente 1xTAE-Puffer. Die einzelnen Taschen des Gels wurden mit jeweils 10-15 µl der DNA-Probe beladen, der zuvor 4 µl Ladepuffer zugesetzt wurde und die Nukleinsäuren bei 80-100 V in der Elektrophoresekammer entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zwecks Größenbestimmung der Fragmente wurde eine Geltasche mit 10 µl eines 1 kb-DNA Längenmarker befüllt.

7. Die Phage-Display-Technologie (Hoogenboom et al., 2000)

7.1. Phagemidbank

Die in dieser Arbeit verwendete Phagemidbank exprimiert ein sehr großes, naives humanes Fab-Repertoire mit einer Diversität von $3,7 \times 10^{10}$ verschiedenen Fab-Antikörpern. Die große Diversität erlaubt die Selektion von Antikörpern mit Spezifität für praktisch jedes Antigen (de Haard et al., 1999). Der Überstand der gelösten Phagen wurde uns in das komplette Repertoire enthaltenden Aliquots von DYAX SA, Liege, Belgien zur Verfügung gestellt.

7.2. Selektion von Phagen-Antikörpern auf biotinylierte MHC-Komplexe

7.2.1. MHC-Peptid-Komplexe

Der monomere biotinylierte MHC-Peptid-Komplex (b-pMHC) wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Immanuel Luescher aus Lausanne zur Verfügung gestellt. Hierbei wurden die MHC-Peptid-Monomere wie vorbeschrieben synthetisiert (Altman et al., 1996): Die Schwerkette, das β_2 -Mikroglobulin sowie das entsprechende HLA-A*0201-restringierte Peptid wurden in Lösung neu gefaltet. Das 45 kD Produkt wurde anschließend mittels Größenausschlusschromatographie isoliert und dann unter Verwendung von rekombinantem BirA in Anwesenheit von Biotin, ATP und Mg^{2+} biotinyliert. Die hier selektionierten Fabs erkennen die beiden Epitope des CT-Antigens SSX2₄₁₋₄₉ bzw. SSX2₁₀₃₋₁₁₁ im HLA-A*0201-Kontext.

Folglich handelt sich um die Komplexe SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 (RLQGISPKI) und SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 (KASEKIFYV).

7.2.2. Prinzip der Selektionen

Um das Repertoire der Phagen-Bank in seiner Gesamtheit zur Verfügung zu haben, wurden für die Selektion Phagen in zehn- bis hundertfacher Menge der Diversität der Phagen-Bank eingesetzt. Das Volumen dieser Lösung betrug 500 μ l. Zur Quantifizierung der eingesetzten Menge wurden 10 μ l der Phagen-Lösung entnommen und eine Verdünnungsreihe pipettiert (s. 7.2.3.) und der sogenannte Input-Titer anhand colony-forming units (cfu) nach Infektion von *E.coli* (TG1) bestimmt. Die Phagen-Lösung

wurde in einem ersten Schritt im Verhältnis 1:1 mit 4% Milchpulver/PBS (4% M/PBS) für 60 Minuten in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei RT auf einem Laborrad vorgeblockt. Dieser Schritt diente dazu, unspezifische Interaktionen infektiöser Phagen mit der Plastikoberfläche der Eppendorf-Gefäße und dem Antigen zu inhibieren. Gleichzeitig wurden Streptavidin-Dynabeads vorbereitet. Diese bestehen aus einem supermagnetischen Polystyrol-Kern, an den kovalent Streptavidin gebunden ist (s. Dynal Biotech Produktmonographie). Streptavidin ist ein Protein von Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii*, das aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist, welche jeweils mit hoher Affinität ($K_a \sim 10^{14} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$) ein Biotin-Molekül binden. Dabei wurden für die erste Selektionsrunde 600 µl Streptavidin-Dynabeads verwendet, für die zweite Runde 200 µl und für die dritte Runde noch 100 µl. Die Streptavidin-Dynabeads wurden mit 1 ml 4%M/PBS für 1-2 Stunden bei RT ebenfalls auf dem Rad vorgeblockt.

Um Streptavidin-Binder aus dem Phagen-Repertoire zu entfernen, wurde die Phagen-Lösung zu Beginn der zweiten Runde eine halbe Stunde mit 100 µl Streptavidin-Dynabeads präinkubiert, welche anschließend in einem magnetischen Feld (Magnet Dynal MPC[®]-S) wieder entfernt wurden. Der verbleibende Überstand wurde weiter verwendet.

Nach den 60 Minuten Präinkubation der Phagen mit 4%M/PBS wurde der biotinylierte MHC-Peptid-Komplex, der als Antigen diente, direkt in das Phagen-4%M/PBS-Gemisch pipettiert und für eine Stunde bei RT auf dem Rad inkubiert. Die Antigenmenge wurde analog zu den Streptavidin-Dynabeads von Runde zu Runde reduziert. Dies führt zur selektiven Anreicherung von Phagen, die eine hohe Affinität gegenüber den Zielmolekülen aufweisen. In der ersten Runde wurden 300 nmol Antigen eingesetzt, in der zweiten Runde 100 nmol und in der dritten Runde 20 nmol.

Nach Vorinkubation der Streptavidin-Dynabeads in 4%M/PBS wurden diese mit Hilfe eines Magnets (Dynal MPC[®]-S, Magnetständer von Dynal) an den Rand des Eppendorf-Reaktionsgefäßes gezogen und die überschüssige Lösung, welche nun keine Beads mehr enthielt, abpipettiert. Die Streptavidin-Dynabeads wurden anschließend in dem Phagen-Antigen-Mix resuspendiert und 15 Minuten bei RT auf dem Rad inkubiert. Dabei findet eine Bindung des Phagen-Antigen-Komplexes an das freie Streptavidin der Dynabeads statt. Die Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen, so dass es zu einer selektiven

Anreicherung von den Phagen kommt, die spezifisch mit dem hier verwendeten MHC-Peptid-Komplex interagieren. Um nicht bindende Phagen zu entfernen, wurden die Phagen-Antigen-Dynabeads-Komplexe zunächst sechsmal mit 2% M/PBS/0,1% Tween 20 gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Dynabeads mit Hilfe des Magneten an den Rand des Reaktionsgefäßes gezogen und die Waschlösung vorsichtig abpipettiert. Danach wurden die Phagen-Antigen-Dynabeads-Komplexe in 1 ml PBS resuspendiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde nochmals sechsmal mit PBS/0,1% Tween 20 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Phagen-Antigen-Dynabeads-Komplexe in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das enthaltene Tween 20 durch zweimaliges Waschen mit reinem PBS von den Streptavidin-Dynabeads entfernt.

Nun wurden die Phagen aus ihrer Bindung im Phagen-Antigen-Dynabeads-Komplex eluiert, indem die Beads in 1 ml 100 mM Triethylamin pH 12 für 5-10 Minuten bei RT resuspendiert wurden. Das alkalische Milieu trennt dabei die Bindung der Phagen zu dem biotinylierten MHC-Peptid-Komplex. Die Suspension wurde dann erneut dem magnetischen Feld ausgesetzt, wodurch mittels Abpipettieren des Überstandes die Streptavidin-Dynabeads von den Phagen getrennt werden konnten. Die so eluierten Phagen wurden unmittelbar danach mit 500 µl 1 M Tris-HCl pH 7,4 neutralisiert, um für *E. coli* infektiös zu werden. Zur Bestimmung des Output-Titers wurden vor der jeweils nächsten Selektionsrunde aus der Phagensuspension 10 µl entnommen.

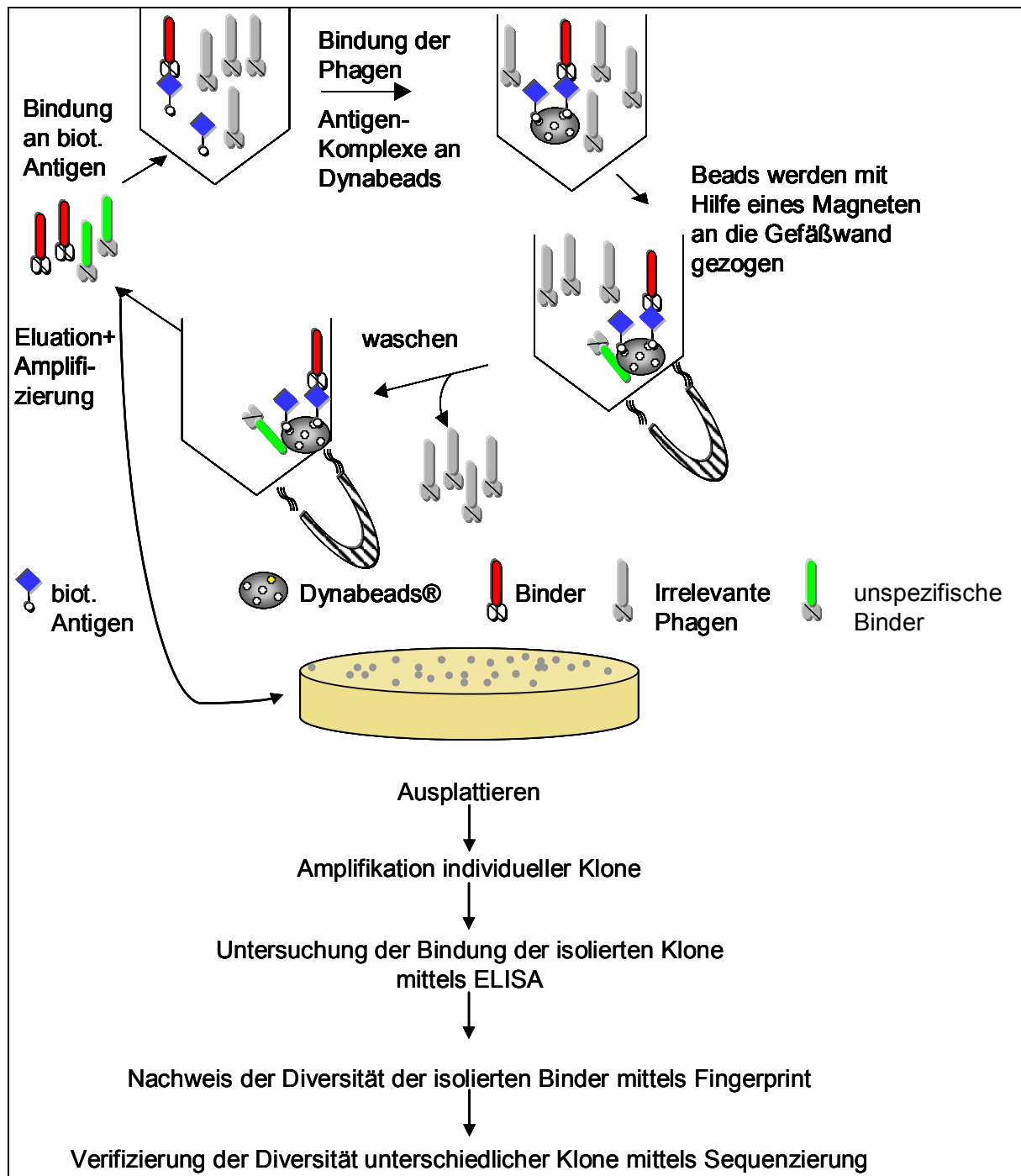


Abb. 4: Schematische Darstellung des Prinzips der Selektionen

7.2.3. Bestimmung des Phagentiters und Phagenamplifikation

Männliche E.coli exprimieren unter bestimmten Bedingungen F-Pili. Dazu gehört der E.coli-Stamm TG1. Nachdem der Phage sich mit Hilfe des Hüllproteins p3 an den F-Pilus angelagert hat, kommt es zur Internalisierung des Phagemids. Über die internalisierte DNA wird dem Bakterium eine Antibiotikaresistenz vermittelt.

Die benötigten TG1-Bakterien wurden in 25 ml 2 x TY-Medium aus einem Glycerol-Stock angeimpft und für mindestens 12 Stunden bei 30°C, 270 U/min wachsen gelassen. Aus dieser Kultur wurden am nächsten Tag 50 ml 2 x TY 1:100 angeimpft. Die neue Kultur wuchs bei 37°C, 170 U/min bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von ca. 0,5, da die Zellen dann einfacher zu infizieren sind.

7.2.3.1. Bestimmung des Phagentiters (Input und Output)

Die Bestimmung des Phagentiters erfolgte vor und nach jeder Selektionsrunde und wurde entsprechend als „Input“ bzw. „Output“ bezeichnet. Zur Input-Bestimmung wurde aus der Phagen/4%MPBS-Suspension (bestehend aus den Phagen der vorhergehenden Runde) vor Zugabe des Antigens 10 µl entnommen. Daraus wurden Verdünnungsstufen (in der Regel von 10^{-8} bis 10^{-11}) in 2 x TY-Medium erstellt und auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Die jeweiligen Verdünnungsstufen wurden anschließend 1:1 mit einer TG1-Bakterienkultur gemischt und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Bakterienkultur eine optische Dichte von 0,5 aufwies. Während der Inkubation kam es zur Infektion der TG1-Bakterien durch die Phagen. Es wurde schließlich von jeder Verdünnungsstufe 1/10 des Gesamtvolumens (100 µl) auf 2 x TY-AG Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte E. coli auf einer separaten Platte inkubiert, wobei auf dieser Platte kein Bakterienwachstum erfolgen darf, da die uninfizierten E. coli keine Antibiotikaresistenz aufweisen.

Die Bestimmung des Output-Titers erfolgte analog zur Input-Bestimmung. Ausgangsprodukt waren in diesem Fall die eluierten Phagen am Ende der Selektionsrunde. In der Regel wurden Verdünnungsstufen von 10^{-2} bis 10^{-6} erstellt und nach Inkubation mit TG1 ebenso auf 2 x TY-AG Platten ausgestrichen.

Zur Bestimmung des Phagentiters (Output) verdünnte man die bei der Selektion eluierten Phagen 10fach bis 100fach in 2 x TY-AG-Medium.

Am nächsten Tag erfolgte die Bestimmung der In- und Output-Titer: Dazu zählt man die Kolonien auf den einzelnen Platten (optimal wäre eine Verdünnungsstufe, bei der man nicht zu viele und auch nicht zu wenige Kolonien findet) und errechnet anschließend die Titer gemäß folgender Formel:

$\text{Phagentiter [Anzahl an Phagen/ml]} = \frac{\text{Anzahl an Kolonien} \times 2}{\text{Verdünnungsstufe} \times \text{ausplattierte Menge}}$

7.2.3.2. *Phagenamplifikation*

Das für die jeweils nächste Runde benötigte Phagenrepertoire wurde gewonnen, indem man 5 ml der exponentiell wachsenden TG1-Bakterienkultur mit 1 ml der eluierten Phagen, gelöst in 4 ml 2 x TY-Medium, vermischt. Diese 10 ml Lösung lässt man für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad zur Infektion inkubieren. Um besser ausplattieren zu können, wurde das Volumen reduziert, indem man die Zellen bei 3.000 g kurz abdrehte und das Zellpellet in 500 µl 2 x TY-AG-Medium resuspendierte. Diese Zellsuspension wurde dann in der ersten Runde der Selektion auf zwei 16 cm² grossen 2 x TY-AG-Platten ausgestrichen, um die maximale Komplexität der Phagen zu erhalten, in den Runden zwei und drei jeweils nur auf einer Platte.

Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 30°C im Brutschrank inkubiert, um am nächsten Tag den Bakterienrasen mit 5 ml 2 x TY-AG-Medium mit Hilfe eines sterilen Kratzer abzulösen. Danach wurde die Lösung konzentriert, indem man sie für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugierte und das entstandene Zellpellet in 1-2 ml 2 x TY-AG resuspendierte. Von der so gewonnenen Lösung wurden Glycerol-Stocks erstellt, indem man das Konzentrat in eine Nunc[®]-Cryotube überführte und steriles Glycerol bis zu einer 15%-igen Endkonzentration hinzufügte. Dieser Stock wurde umgehend bei -70°C eingefroren, um möglichst wenige Bakterien durch das Glycerol abzutöten.

Die so entstandenen Stocks dienten dann wiederum der Gewinnung des Phagenrepertoires für die jeweils anschließende Runde. Diese erstreckte sich über zwei Tage: Zu Beginn wurde aus dem Glycerol-Stock eine Kultur in 50 ml 2 x TY-AG angeimpft und diese bei 37°C, 270 U/min bis zu einem OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert. Daraus wurden im Folgenden 5 ml entnommen, in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt und 1,5 µl M13-K07-Helferphagen aus einem Stock mit einer Phagenkonzentration von ca. $1,8 \cdot 10^{13}$ pfu/ml hinzugesetzt. Diese Suspension wurde dann 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, so dass eine Infektion durch den Helferphagen erfolgen konnte. Danach wurde die Suspension für 10 Minuten bei 3.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das entstandene Zellpellet in 25 ml vorgewärmtem 2xTY-AK resuspendiert und in einen neuen 300 ml-Flasko kolben transferiert. Über Nacht erfolgte dann bei 30°C, 170 U/min die Phagenproduktion. Am nächsten Tag konnte die Reinigung der produzierten Phagen erfolgen.

Hierfür wurde die Suspension in ein steriles 50 ml-Falcon überführt und für 20 Minuten bei 3.000 x g zentrifugiert. Während die Bakterien hierbei pelletiert werden, befinden sich die Phagen nun im Überstand. Zum Überstand wurde 1/5 des Volumens PEG/NaCl hinzugefügt und das Gemisch für mindestens 1 Stunde auf Eis gestellt, was zu einem Ausfallen der Phagen führt. Die PEG-Fällung wurde 1964 von Polson et al. eingeführt (Polson et al., 1964). Das hydrophile, ungeladene Polymer Polyethylenglycol konkurriert mit den Proteinen in wässriger Lösung um das Hydratationswasser und führt ab einer bestimmten Konzentration, welche von der Proteinkonzentration und dem Polymerisationsgrad des PEG abhängt, zu einer reversiblen Fällung des Proteins. Diese Methode ist sehr schonend für Proteine und wird daher häufig auch bei der Proteinkristallisation eingesetzt.

Im nächsten Schritt wurden die Phagen pelletiert, indem man sie für 15 Minuten bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, das Phagenpellet in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Im Folgenden wurden die noch verbleibenden Bakterien durch eine kurze Zentrifugation von 2 Minuten bei 13.000 g entfernt. Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl PEG/NaCl gemischt und schließlich 10-20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Phagen wurden schließlich für 5 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert. Ein letztes Mal wurden die Bakterienreste entfernt, indem nochmals für 2 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert wurde und der Überstand, in dem sich die aufgereinigten Phagen befinden wurde in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Die Phagen konnten nun direkt für Versuchszwecke eingesetzt werden oder mit 15% Glycerol bei -70°C weggefroren werden.

7.2.4. Produktion von Phagen in einer 96-Well-Microtiter-Platte

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, eine große Anzahl von Phagen aus den in der Selektion gewonnenen Klonen zu produzieren. Das Prinzip der Phagenproduktion ist hierbei dasselbe wie in Kapitel 7.2.3.2 beschrieben.

Um mit der Produktion starten zu können, wurden zuerst Kolonien von den nach der Selektion erhaltenen Output-Platten gepickt und in 100 µl 2 x TY-AG-Medium in einer 96-Well-Microtiter-Rundbodenplatte inokuliert. Diese wurden bei 30°C, 255 U/min über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur Überprüfung der Phagenproduktion wurde

einerseits als Positivkontrolle zusätzlich ein Anti-Streptavidin-Phage (Klon F2, zur Verfügung gestellt von Dr. Gerhard Held, Innere Medizin I, Universitätsklinikum des Saarlandes) inokuliert, mit dessen Hilfe man im Anschluss auch das korrekte Coating der ELISA-Platten kontrollieren konnte. Andererseits wurden mehrere Wells als Negativkontrolle auf der Platte nicht mit Bakterien inokuliert, um eine eventuelle Kreuzkontamination während der Phagenproduktion besser ausschließen zu können.

Am nächsten Tag wurden von der so erhaltenen Platte jeweils 2 µl in eine neue 96-Well-Rundbodenplatte-Platte (Costar®) inokuliert, die pro Well 120 µl 2 x TY-AG-Medium enthielt. Das Bakterienwachstum erfolgte danach bei 37°C, 170 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5. In die originale Master-Platte vom Vortag wurde pro Well 35 µl steriles 60%iges Glycerol pipettiert und diese direkt bei -70°C eingefroren. Die so erhaltene Master-Platte diente für alle weiteren Versuche als Repertoire zur Gewinnung von Phagen und Fab-Antikörpern.

Nach Erreichen der OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurde in jedes Well 40 µl 2 x TY-AG-Medium pipettiert, welches ca. 2×10^9 Phagen/ml Helferphage M13K07 enthält (aus einem Stock mit $1,8 \times 10^{13}$ pfu/ml entnimmt man 32,5 µl Helferphagen auf 10 ml Medium). Hierbei sollte das Verhältnis von Phagen zu Bakterien bei ungefähr 20:1 liegen. Das Gemisch wurde dann 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert und die Platte danach für 10 Minuten bei 450 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde darauf geachtet, den Überstand komplett abzupipettieren, da jede Anwesenheit von Glucose dazu geführt hätte, dass die Bakterien diese zuerst verbraucht hätten und erst danach mit der Phagenproduktion begonnen hätten. Dadurch wäre es zu einer ineffektiven Phagenproduktion mit einer geringeren Ausbeute gekommen.

Nach Entfernen des Überstandes wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, indem das Zellpellet in 120 µl 2 x TY-AK resuspendiert wurde und man die Bakterien für 14 bis 18 Stunden bei 30°C, 255 U/min wachsen ließ. Am dritten Tag wurde schließlich die Bakterien-Phagen-Suspension für 10 Minuten bei 450 x g zentrifugiert und der Überstand, welcher die produzierten Phagen enthielt, im ELISA eingesetzt.

7.2.5. ELISA zur Detektion von Phagen-Antikörper-Fragmenten **(Henderikx et al., 1998)**

Die Spezifität der einzelnen Phagen-Klone aus den Selektionsrunden wurde mittels ELISA überprüft. Hierbei wurden die benötigten MHC-Peptid-Komplexe folgendermaßen auf die Nunc®-Maxisorb-Platte aufgebracht:

Im ersten Schritt wurde die Platte mit 100 µl/Loch biotinyliertem BSA (b-BSA) der Konzentration 2 µg/ml gelöst in PBS für eine Stunde bei 37°C gecoatet. Danach wurde die Platte 3 Mal mit PBS gewaschen und für eine Stunde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit 10 µg/ml Streptavidin (gelöst in PBS; 100 µl/Loch) inkubiert. Im Anschluss wurde wieder 3 Mal mit PBS gewaschen, bevor dann in einem dritten Schritt die biotinylierten MHC-Peptid-Komplexe über Nacht bei 4°C an das Streptavidin gekoppelt wurden.

Das Aufbringen des biotinylierten BSA-Streptavidin-Spacers bewirkte, dass die ebenfalls biotinylierten MHC-Peptid-Komplexe (b-pMHC) ihre korrekte Faltung behalten. Würde man die MHC-Peptid-Komplexe direkt an das Plastik der 96-Well-Platte binden, wäre eine Veränderung der Komplexfaltung eine mögliche Folge mit der Konsequenz, dass keine Aussage bezüglich der Spezifität der Phagen mehr möglich wäre (Chames et al., 2000). Zur Kontrolle der korrekten Faltung und Stabilität der Komplexe während des Bindungsassays erfolgte eine Überprüfung ihrer Reaktivität mit konformationsspezifischen monoklonalen Antikörpern. Es wurden hierzu der monoklonale HLA Klasse I Antikörper W6/32, welcher die α 3- und α 2-Domäne der HLA-Subtypen A, B und C sowie das β ₂-Mikroglobulin erkennt (Barnstable et al., 1978) und der monoklonale Antikörper Tü155 (Hutter et al., 1996), welcher nur peptidbeladene MHC-HLA-A2-Komplexe erkennt (Chames et al., 2000), eingesetzt.

Am zweiten Tag wurde die mit MHC-Peptid-Komplexen beladene Platte dreimal mit PBS gewaschen, und anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 120 µl 2%M/PBS pro Well für mindestens 30 Minuten bei RT geblockt. Zwischen den sich anschließenden Inkubationsschritten, welche alle auf einem Schüttler durchgeführt wurden, erfolgte jeweils ein Waschschrift, bei dem dreimal mit PBS/0,1%Tween 20 und dreimal mit PBS gewaschen wurde.

Als nächstes wurden 50 µl 4%M/PBS vermischt mit jeweils 25 µl des Phagenüberstandes aus Kapitel 7.2.4 in jedes Well pipettiert und für 1-1,5 Stunden inkubiert. Zur Phagendetektion wurde dann in jedes Well 100 µl anti-M13 1:2.000 verdünnt in

2%M/PBS pipettiert und eine Stunde bei RT inkubiert. Zur Detektion des anti-M13 wurde ein HRP-konjugierter anti-Maus-Antikörper im Verhältnis 1:2.000 verdünnt in 2%M/PBS für ebenfalls eine Stunde in die jeweiligen Löcher gegeben. Anschließend wurde viermal mit PBS/0,1% Tween 20 sowie einmal mit PBS gewaschen. In einem letzten Schritt wurde der ELISA über eine Farbreaktion entwickelt; diese wurde mit Hilfe des TMB-Peroxidase Kits durchgeführt. Dabei wurden die im Kit enthaltenen Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 100 µl der entstandenen Mischlösung in die einzelnen Löcher pipettiert. Nach deutlichem Sichtbarwerden einer Blaufärbung bei den Positivkontrollen wurde die Reaktion, bevor eine Verfärbung der Negativkontrollen stattfand, durch Zugabe von 50 µl/Well 1 M H₂SO₄ gestoppt. Nach Beenden der Reaktion kommt es zu einem Farbumschlag in den Wells von Blau nach Gelb. Die Intensität dieses gelben Farbtons kann man nun quantifizieren, indem man die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader misst.

7.2.6. PCR-Amplifikation und Fingerprint der positiven Klone

7.2.6.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (Saiki et al., 1988)

Die im ELISA selektiven Klone werden nun in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) auf ihre Diversität hin überprüft.

Hierbei ermöglicht die PCR die gezielte in vitro-Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu einer maximalen Größe von 12 kb. Die Vervielfältigung doppelsträngiger DNA verläuft exponentiell. Die PCR läuft in der Regel über 25 bis 50 Zyklen und wird in einem Thermocycler durchgeführt. Dieses Gerät erhitzt und kühlt die Proben präzise auf die für die jeweiligen Schritte gewünschte Temperatur. Zusätzlich besitzt es einen beheizbaren Deckel, so dass Verdunstungen effektiv verhindert werden können.

Jeder PCR-Zyklus verläuft in drei Schritten:

- Denaturierung: Die noch doppelsträngige DNA wird auf 94-96°C erhitzt. Dadurch werden die zwischen den beiden Strängen bestehenden Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen, was eine Strangtrennung zur Folge hat. Weiterhin kommt es zu einem Stopp aller enzymatischer Reaktionen, wie z.B. der Elongation eines vorhergehenden Zyklus. Im ersten Zyklus wird die DNA für eine längere Zeit erhitzt, so dass sichergestellt werden kann, dass sowohl die Ausgangs-DNA, als auch die Primer als Einzelstränge vorliegen.

- Primerhybridisierung (primer annealing): Nun wird die Temperatur abgesenkt, so dass sich die Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Stränge anlagern können. Die erforderliche Temperatur hängt von den jeweiligen Primern ab, liegt jedoch in der Regel 2-3°C unter deren Schmelzpunkt (zwischen 50 und 60°C).
- Strangverlängerung (Elongation): In diesem Schritt kommt die im Reaktionsgemisch enthaltene Taq-Polymerase zum Einsatz: Sie füllt die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Dabei beginnt sie am 3'Ende des angelagerten Primers und nutzt den Ausgangsstrang als Matrize. Die benötigte Temperatur hängt auch hier von der jeweiligen Polymerase ab und liegt in der Regel zwischen 68 und 72°C. Gleiches gilt für die Dauer der Elongation.

In dieser Arbeit wurden die DNA-Amplifikationen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Denaturierung für 10 Minuten bei 94°C
 - Denaturierung für 45 Sekunden bei 95°C
 - Annealing für 45 Sekunden bei 58°C
 - Elongation für 90 Sekunden bei 72°C
- } 35 Zyklen

Pro Probe wurde ein PCR-Reaktionsgemisch, bestehend aus folgenden Komponenten verwendet:

- 0,4 µl dNTP Mix (100 mM)
- 2 µl Taq-Reaktionspuffer (10 x)
- 1,2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,05 µl FORWARD primer fd-tet-seq-24 (100 µM)
- 0,05 µl BACK primer pUC reverse (100 µM)
- 0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
- 15,2 µl H₂O_{dest}
- 1 µl DNA aus Mini-Präp

Gesamt: 20 µl

7.2.6.2. *Fingerprint der amplifizierten DNA*

Die durch die PCR erhaltene DNA wurde nun in einem zweiten Schritt mit Hilfe des gängigen Restriktionsenzym BstN-1 verdaut. Die Erkennungsstelle dieses Restriktionsenzym sieht wie folgt aus:



Hierzu wurden zu dem aus der PCR erhaltenen DNA-Mix folgende Komponenten zu jeder Probe pipettiert:

- 3,6 µl NEB2-Puffer (10 x)
- 0,3 µl BstNI (10 U/µl)
- 0,36 µl BSA (100 x)
- 11,74 µl H₂O_{dest.}

Dieser Mix wurde dann für 2-3 Stunden bei 60°C verdaut und anschließend mit Hilfe eines 3%-igen Agarosegels analysiert (vgl. Kapitel 1). Um besser abschätzen zu können, wie weit die DNA im Agarosegel schon gelaufen ist, wurden jeder Probe 4 µl des Ladepuffers zugesetzt und jeweils 15 µl der zu analysierenden Probe in eine Geltasche pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde beendet, wenn bei jedem Klon ein spezifisches Bandenmuster zu erkennen war, welches wiederum Rückschlüsse über die Diversität der Phagenklone erlaubte.

7.2.7. Expression und Reinigung löslicher Fab-Antikörper (McCafferty et al., 1990)

7.2.7.1. Expression der löslichen Fab-Antikörper

Mit Hilfe dieser Methode wurden Fab-Antikörper produziert, die bei weiteren Versuchen wie z.B. ELISA, Western Blot, FACS, usw. eingesetzt werden konnten.

Das Prinzip der Methode liegt darin begründet, dass von E.coli produzierte Fab-Antikörper aus dem Periplasma der Bakterien gereinigt werden. Die Gewinnung der Antikörper aus dem Periplasma bringt mehrere Vorteile zugleich mit sich: Einerseits herrscht in diesem Milieu eine geringe Protease-Aktivität, andererseits kommen weniger die Gewinnung störende Proteine als im Zytoplasma oder im Überstand vor, und der zu gewinnende Antikörper liegt in einer höheren Konzentration vor.

Induziert man eine Bakterienkultur, welche das Antikörper-kodierende Plasmid enthält, in 2 x TY-A-Medium mit wenig Glucose (0,1%) und Isopropylthio- β -galactosid (IPTG), werden lösliche Fab-Antikörper produziert, in das Periplasma transportiert und über vier Stunden hinweg angereichert. IPTG wirkt hierbei als Aktivator des *lac*-Operons, indem es an den Repressor LacR bindet und damit dessen Wechselwirkung mit dem Operator inhibiert. Im Gegensatz zur Lactose wird IPTG nicht im natürlichen Metabolismus von Bakterien umgesetzt, seine Konzentration bleibt deshalb während eines Versuchs konstant und das Gen bleibt aktiv.

Im Periplasma wird dabei die Signalsequenz, welche den Transport der Proteine veranlasst hat, abgetrennt und der Antikörper durch korrekte Faltung sowie durch Ausbilden von Disulfidbrücken voll funktionsfähig.

Zur Gewinnung der Fabs wurden die TG1-Klone, die das Antikörper-kodierende Plasmid von Interesse enthielten, gepickt und in 50 ml 2 x TY-AG-Medium über Nacht bei 30°C, 170 U/min inkubiert. Diese Kultur wurde am nächsten Morgen 1:100 in 2 x TY-AG-Medium (100 μ g/ml Ampicillin, 0,1% Glukose) inokuliert, bei 37°C, 270 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 hochwachsen gelassen und dann IPTG in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt. Nun ließ man die induzierte Bakterienkultur für drei bis vier Stunden (je nach Klon wurde ausgetestet mit welcher Induktionszeit die größten Ausbeuten erreicht werden konnten) bei 30°C, 270 U/min weiter wachsen. Durch Zugabe von IPTG kommt es zur Produktion und Sekretion von Fab-Antikörpern ins Periplasma der Bakterien. Nach Ablauf der drei bis vier Stunden wurden die Bakterienzellen für 15 Minuten bei 3.000 x g und 4°C in sterilen 500 ml Plastikgefäßen zentrifugiert und im Anschluss sorgfältig der Überstand entfernt. Um eine höhere Ausbeute zu erreichen, wurde das entstandene Pellet nun für mindestens zwei Stunden bei -70°C, in der Regel aber über Nacht, eingefroren. Durch das Einfrieren der Bakterien wird die Bakterienmembran löchrig und somit später das Herauslösen der Peptide aus dem Periplasma erleichtert.

Am nächsten Tag wurden die eingefrorenen Bakterienpellets bei RT aufgetaut, um nach Gewinnung der Fab-Antikörper mit der Reinigung zu beginnen. Zur Präparation wurde das Bakterienpellet mit je 8 ml eisgekühltem TS/EDTA-free Proteinaseinhibitor-Cocktail resuspendiert, die Suspension in ein steriles 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 15 Minuten in eine Eisbox auf eine Wippe gelegt, so dass eine gleichmäßige Durchmischung erfolgen konnte. Währenddessen wurden die Plastikzentrifu-

geengefäße mit je 8,8 ml TS/H₂O_{dest} (Mischungsverhältnis 1:3) ausgespült. Diese Lösung wurde dann zu der Bakteriensuspension hinzugegeben und erneut 30 Minuten in der Eisbox auf der Wippe inkubiert. Man macht sich hierbei zu Nutze, dass die bakterielle Zellwand zunächst mittels eines osmotischen Kälteschocks lysiert wird und dann rasch in einer hypoosmolaren Lösung verdünnt wird. Schließlich wurde die Suspension für 15 Minuten bei 8.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand enthielt nun die löslichen Fab-Antikörper, so dass mit der Reinigung begonnen werden konnte. Wichtig ist, dass alle Schritte in kühler Umgebung ablaufen, um die Proteaseaktivität so gering als möglich zu halten.

7.2.7.2. Reinigung löslicher Fab-Antikörper

Bei der Reinigung der Fab-Antikörper macht man sich den 6 x Histidin-Tag zu nutze; über diese Markierung werden die Fab-Antikörper an Talon[®]-Resins gebunden. Die Talon[®]-Resins enthalten Co²⁺-Ionen, woran die freien N-Atome des Histidin binden (Chaga et al., 1999; Porath, 1992).

Für die Reinigung benötigt man pro 800 ml-Bakterienkultur 500-800 µl homogene Talon[®]-Lösung. Die Talon[®]-Resins wurden in einem Reaktionsgefäß mit 50 ml PBS pH 8 einmal gewaschen, bei 320 x g drei Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf dieses Talon[®]-Pellet wurde der in Kapitel 7.2.7.1 gewonnene Überstand gegeben und die Suspension für eine Stunde bei 4°C auf dem Rollbrett inkubiert. Dabei kommt es zur Bindung der Fab-Antikörper mittels des Histidin-Tags an die Co²⁺-Ionen der Talon[®]-Resins. Nach der Inkubation wurde die Suspension für 3 Minuten bei 320 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig, ohne die Talon[®]-Resins aufzuwirbeln, abgekippt und verworfen. Es folgte ein Waschschrift, bei dem die Talon[®]-Resins mit 50 ml PBS pH 8/0,1%Tween 20 für 10 Minuten bei 4°C auf dem Rollbrett gewaschen wurden. Nach erneuter Zentrifugation für 3 Minuten bei 320 g wurden die Talon[®]-Resins in 5 ml PBS pH 8 resuspendiert und in eine verschlossene Biorad-Schwerkraftsäule überführt. Die Säule wird mit PBS pH 8/0,1% Tween 20 aufgefüllt und anschließend abgewartet, bis sich die Talon[®]-Resins auf dem Sieb gesammelt haben. Nun wurde die Verschlusskappe der Säule geöffnet, so dass die Waschlösung langsam an den Resins vorbeilaufen konnte. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Um die gebundenen Fab-Antikörper

schließlich zu eluieren, wurden die Talon[®]-Resins mit 1-2 ml einer 100 mM Imidazol-Lösung suspendiert und 1-2 Minuten inkubiert.

Das Imidazol verdrängt dabei das Histidin aus der Bindung zum Co^{2+} aufgrund seiner höheren Affinität. Dies konnte man auch anhand eines Farbwechsels der Talon[®]-Resins erkennen, die ihre Farbe von einem eher farblosen Rosa zu einem intensiven Pink veränderten.

Die so eluierte Fraktion wurde danach über Nacht bei 4°C in Dialyseschläuchen gegen 5 Liter PBS unter kontinuierlichem Rühren dialysiert, wobei nach 2 Stunden ein Wechsel der Dialyseflüssigkeit erfolgte. Bei dieser Dialyse soll das enthaltene Imidazol ausgewaschen werden.

Um die Reinheit der Peptide zu kontrollieren, wurden diese mittels SDS-PAGE (12%) aufgetrennt und anschließend einer Coomassie-Färbung unterzogen.

7.2.7.3. Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Voraussetzung hierzu sind Bedingungen, unter denen sowohl die Dissoziation der Proteine in die einzelnen Polypeptide als auch deren Linearisierung gewährleistet sind. Nach Hitzedenaturierung und Verwendung reduzierender Agenzien binden die denaturierten Polypeptide das stark anionische Detergens SDS und erhalten so eine negative Ladung. Da die Menge des gebundenen SDS proportional zum Molekulargewicht des entsprechenden Polypeptids ist (Shapiro et al., 1967), wandern die SDS-Polypeptid-Komplexe bei der Elektrophorese nun in Abhängigkeit von der Größe des Polypeptids unterschiedlich weit im Polyacrylamidgel, wodurch es zu einer Auftrennung der unterschiedlichen Polypeptide kommt. Die Verwendung von Zwei-Phasen-Gelen mit Konzentrierung und Ausrichtung aller SDS-Polypeptidkomplexe in einem möglichst kleinen Volumen in einem oberen Gelabschnitt („Stacking Gel“) und Auftrennung anschließend im unteren Gelabschnitt erhöht dabei die Auflösung der Gele (King et al., 1971).

Zur Durchführung wurden nach Standardprotokollen SDS-Polyacrylamidgele gegossen, mit den denaturierten Proteinen (5 min/100°C) geladen und die Elektrophorese unter Verwendung eines Tris-Laufpuffers (Laemmli-Puffer) bei 20 mA durchgeführt.

7.2.7.4. Coomassie-Färbung

Die Proteine können in den SDS-PAGE-Gelen durch Anfärben mit Coomassie sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Gele gewöhnlich mindestens 30 Minuten lang in Coomassiefärbelösung geschwenkt, wobei die Färbung auch sehr gut über Nacht möglich ist. Hierbei wurden die aufgetrennten Proteine gleichzeitig mit Methanol und Essigsäure fixiert und mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Zum Entfärben wurden die Gele über Nacht in Entfärbelösung auf einem Kipptisch geschwenkt, bis die Proteinbanden schließlich deutlich zu erkennen waren.

7.2.7.5. Westernblot

Bei dieser Methode werden zunächst in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Dies erfolgt im sog. Semi-Dry-Verfahren. Dabei bleibt das sich bei der Auftrennung ergebende Proteinmuster erhalten, und es entsteht eine Kopie des Gels. Die Proteine werden auf der Membran immobilisiert, indem sie bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkung an die Membran binden. Da sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitgehend erhalten bleibt, können diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch identifiziert werden (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979).

Die für den Proteintransfer eingesetzte Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF Membran, Immobilon-P Membran) wurde vor Beginn des Proteintransfers wie folgt präpariert: Im ersten Schritt wurde die Immobilon-P Membran für 15 Sekunden in 100% Methanol eingeweicht, anschließend 2 Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelegt und im letzten Schritt für mindestens 10 Minuten in einen Transfer-Puffer gegeben.

Der Aufbau des „Immunoblot-Sandwiches“ ist in der nachfolgenden Zeichnung dargestellt:

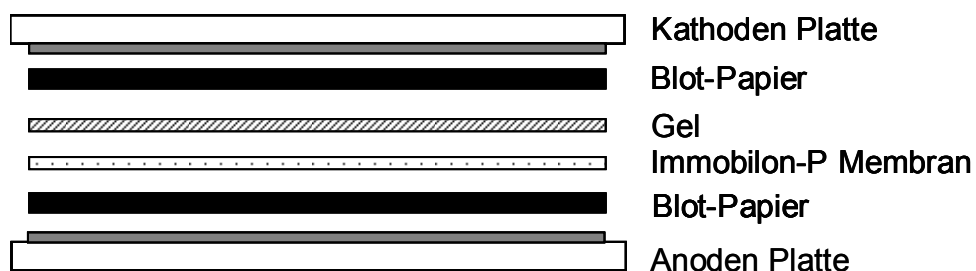


Abb. 5: Aufbau des Immunoblot-Sandwiches beim Semi-Dry-Verfahren

Nach Aufbau des Blots wurde sorgfältig darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen mehr zwischen den einzelnen Schichten befinden. Der Transfer erfolgte für 30-40 Minuten bei 25 V. Nach Abschluss des Transfers wurde der Bloterfolg durch eine Kontrollfärbung mit Ponceau-S Rot kontrolliert: Dazu wurde die Membran für eine Minute in einer Ponceau-Lösung gefärbt und anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ wieder entfärbt. Vor dem Entfärben musste noch der Längenmarker auf die Membran übertragen werden. Anschließend wurde die Membran in 5% MPBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Dies diente der Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Am folgenden Tag erfolgten zunächst ein Waschschrift mit PBS und anschließend eine immunologische Färbung mit den jeweiligen Antikörpern. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurde jeweils dreimal mit PBS/0,1% Tween 20 und dreimal mit reinem PBS gewaschen.

Die Entwicklung erfolgte mit drei verschiedenen Primärantikörpern wie im Folgenden beschrieben:

Entwicklung 1:

- Färbung mit Maus-anti-His, 1:1.500 verdünnt in PBS/3% BSA, für 60 Minuten
- Entwicklung über Ziege-anti-Maus-Ig-HRP, 1:3.000 verdünnt in 10% MPBS, für 30 Minuten
- Entwicklung mit ECL

Entwicklung 2:

- Färbung mit anti-c-myc (9E10), 1:600 verdünnt in 5 % MPBS, für 60 Minuten
- Entwicklung über Ziege-anti-Maus-Ig-HRP, 1:3.000 verdünnt in 10% MPBS, für 30 Minuten
- Entwicklung mit ECL

Entwicklung 3:

- Färbung mit Streptavidin-HRP, 1:15.000 verdünnt in 10% MPBS für 15 Minuten
- Entwicklung mit ECL

Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym HRP (horseradish peroxidase) katalysiert hierbei die Oxidation des in der Entwicklungslösung enthaltenen Luminol,

was zu einer Emission von Licht führt und somit einen Röntgenfilm belichten kann. Nach Entwicklung dieses Films stellen sich die positiven Banden schwarz dar.

7.2.8. ELISA zur Detektion von aufgereinigten Fab-Antikörpern

Die Durchführung des ELISA erfolgt analog zu Kapitel 7.2.5. Statt des Phagenüberstandes wurde eine Fab-Antikörper-Lösung mit der gewünschten Konzentration verwendet. Die Fab-Antikörper wurden mittels des murinen anti-c-myc Antikörpers 9E10 mit einer Konzentration von 1 µg/ml detektiert. Die weitere Entwicklung erfolgte wie in Kapitel 7.2.5 beschrieben.

8. Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion in den Vektor pCES1

Die Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion im Vektor pCES1 erfolgte in mehreren Schritten: Zu Beginn wurde aus der Bakterienkultur der ausgewählten Klone das Plasmid isoliert und aufgereinigt. Als nächstes konnte mittels der Enzyme NotI und EcoRI über einen Restriktionsverdau eine Linearisierung erfolgen; gleichzeitig wurde dabei die für den c-myc-tag, den Histidin-tag sowie ein Großteil der für das Protein III kodierenden Region herausgeschnitten. Dies zeigte sich im Agarose-Gel in Form zweier Banden: Das aus dem Vektor herausgeschnittene Fragment mit einer Größe von 1.250 bp sowie der restliche Vektor mit einer Größe von 4.700 bp.

In einem weiteren Schritt konnte nun der restliche pCES1-Vektor, in welchen die BirA-Region kloniert werden sollte, aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und über GFX-Säulen gereinigt werden.

Die gereinigte DNA wurde schließlich einer Ligation zugeführt. Dabei wurde durch die Restriktionsenzyme NotI und EcoRI ein DNA-Fragment, welches eine für 14 Aminosäuren codierende Hinge-Region (aufgrund ihres Ursprungs aus humanem IgA auch IgA-Hinge genannt), eine für die 15 Aminosäuren umfassende Biotin-Akzeptor-Region (BAD) sowie schließlich eine für sechs Histidine kodierende Region (His-Schwanz) enthält, eingefügt. Dieses DNA-Fragment wurde mittels einer PCR auf ein uns zur Verfügung gestelltes Plasmid amplifiziert. Dazu kamen die beiden Primer 5'BirAtag Not sowie 3'BirAtag EcoRI zum Einsatz. Die Ligation erfolgte gemäß des in Kapitel 8.3.5 erläuterten Protokolls über Nacht bei 4° C.

Im Folgenden ist die Aminosäuresequenz des eingefügten DNA-Fragments dargestellt:

SPSTPPTPSPSTPP AS **GGLNDIFEAQKIEWH** GSSKYKY **HHHHHH**
 IgA-Hinge BAD His-Schwanz

Nach Abschluss der Ligation erfolgte zunächst zur Kontrolle eine Transformation des Vektors in den kompetenten *E.coli*-Stamm TG1. Diese wurden dann auf 2xTY-AG-Platten ausgestrichen, anschließend nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C Kolonien gepickt und in 2 x TY-AG-Medium angeimpft. Aus den Bakterienkulturen wurde nun erneut das Plasmid isoliert. Der Erfolg der Ligation wurde schließlich durch eine PCR kontrolliert: Dazu wurde zum einen der 5'-Primer CH1 reverse, welcher in der CH1-Region des ursprünglichen pCES1-Vektors zu binden vermag, sowie der 3'-Primer BirAtag EcoRI, welcher in der neu klonierten BirARegion zu binden vermag, verwendet; zum anderen wurde an Stelle des 5'-Primers CH1 der 5'-Primer BirAtag Not verwendet. Da die beiden BirAtag-Primer nur nach erfolgreicher Ligation die DNA binden können und somit nur dann eine Bande im Agarose-Gel sichtbar wird, erfolgte auf diese Weise eine Ligationskontrolle.

Anschließend wurde in einem nächsten Schritt die DNA in den *E.coli*-Stamm AVB101 (Avidity) transformiert. Dieser enthält das Plasmid pBIRAcM, welches einerseits für das Enzym Biotin-Ligase kodiert, sowie andererseits auch für eine Chloramphenicol-Resistenz kodiert. Nach Transformation des pCES1-Vektors besteht somit eine Doppel-Resistenz gegen Ampicillin und Chloramphenicol, welche entsprechend beachtet werden muss.

In einem letzten Schritt musste schließlich noch nachgewiesen werden, dass es nach Klonierung der BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion nach wie vor zur Produktion strukturell intakter Fab-Antikörper kommt. Dazu wurden unter Beachtung der nun vorliegenden Doppelresistenz gemäß dem in Kapitel 7.2.7 beschriebenen Protokoll durch Zusatz von 50 µM Biotin lösliche Fab-Antikörper produziert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und schließlich das Biotin in einem Western-Blot mittels des Antikörpers Streptavidin-HRP nachgewiesen.

Im Anschluss findet sich eine Übersicht über die Sequenzen der in diesem Teil der Arbeit beschriebenen Primer:

5'-BirAtag Not: 5'-GGG GGG GCG GCC GCA TCT CCG TCT ACT C-3'

3'-BirAtag EcoRI: 5'-GGG GGG GAA TTC TAG TGA TGG TGA TGA TG-3'

5'-CH1 rev.: 5'-CCC TGA CCA GCG GCG TCC A-3'

8.1. Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl₂-Methode) (Kushner, 1978)

Als kompetente Bakterien bezeichnet man Stämme, die eine erhöhte Fähigkeit besitzen, Fremd-DNA während einer Transformation aufzunehmen. Zu ihrer Herstellung wurden 30 ml LB-Medium mit 50 µl des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 2 ml entnommen und in 200 ml frisches LB-Medium überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,45 bei einer Wellenlänge von 600 nm. Anschließend wurde die Kultur in einem 400 ml Zentrifugengefäß für 10 Min bei 3.000 x g (bei 4°C) zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 100 ml Transformationspuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 25 Minuten. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 Min, 3.000 x g bei 4°C) wurde das Pellet in 20 ml Transformationspuffer resuspendiert, und nach Zugabe von 7% DMSO und Aufteilung in mehrere Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei -80° C

8.2. Transformation (Lederberg et al., 1974)

Als Transformation bezeichnet man eine Methode, bei der gelöste DNA in eine Bakterienzelle eingeschleust wird.

Während einer halbstündigen Inkubation eines Bakterien-DNA-Gemisches, bestehend aus Bakterien des *E.coli*-Stammes AVB101 sowie maximal 5% Mini-DNA und 1% DMSO, auf Eis, lagerte sich die negativ geladene DNA spontan an Bakterienzellwände an. Dabei musste darauf geachtet werden, dass während dieser Inkubationszeit das Gemisch nicht geschüttelt wird. Bei einem Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad wurde die Zellmembran der Bakterien kurzzeitig permeabel, so dass die DNA ins Innere der Zellen gelangen konnte. In der Regel wurde vor einer Kultivierung der Zellen in LB-Medium oder auf LB-Platten und nach einer ca. zwei Minuten dauernden Regeneration auf Eis eine Vorkultur für eine Stunde bei 37°C in 250 µl SOC-Medium durchgeführt. Dabei bauen die transformierten Bakterien die durch das aufgenommene Plasmid neu erworbenen Resistenzeigenschaften auf.

8.3. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

8.3.1. TENS-Methode

Die Reinigung von Plasmid-DNA nach der TENS-Methode beruht auf der alkalischen Lyse von Zellen.

Zunächst wurden 1,5 ml der Bakterienkulturen, welche über Nacht hochgewachsen waren, eine Minute bei 19.000 x g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 50 µl Puffer P1 resuspendiert, 300 µl TENS-Puffer hinzugefügt und das Gemisch geschwenkt. Dabei wurde durch die Komponenten NaOH, dem Detergenz SDS und Tris-Base die Lyse vorangetrieben. Nach 2-4 Minuten erfolgte die Zugabe von 150 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) wodurch Proteine, genomische DNA und andere Zellbestandteile präzipitiert wurden. Nach Zentrifugieren (für 4 Minuten bei 19.000 g) des „Zellschrotts“ wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Lediglich die im Verhältnis zu den anderen Bestandteilen relativ niedermolekularen Plasmide (und Salze) blieben in Lösung und wurden mit 1 ml eiskaltem Ethanol (95%) gefällt und erneut bei 4°C für 5 min bei 19.000 x g zentrifugiert, so dass diese pelletiert wurden. Nach anschließendem Waschen in 70% eiskaltem Ethanol, bei dem die ausgefällten Salze entfernt wurden, wurde die DNA in 30 µl H₂O_{dest.} resuspendiert.

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass man den Puffer schnell und billig selbst herstellen und die DNA-Isolation in einer relativ kurzen Zeitspanne durchführen kann. Allerdings ist die gewonnene Plasmid-DNA relativ unrein, so dass dieses Verfahren nur für analytische Zwecke zum Einsatz kommt.

8.3.2. Isolation von DNA aus Agarosegelen (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare)

Bei dieser Anwendung wird DNA aus Agarosegelen wiedergewonnen. Dazu werden die Gelstücke mit Capture-Puffer bei 60°C aufgeschmolzen. Dieser begünstigt die Anlagerung von DNA an die Glasfibernmatrix und entfernt ebenso Proteine und Verunreinigen. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Elution in Wasser.

8.3.3. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Alle Sequenzierungen wurden in folgendem Institut durchgeführt:

Institut für Immunologie, Genetik und Transplantationsimmunologie am Klinikum Kaiserslautern, Postfach 2565 / 67653 Kaiserslautern

8.3.4. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Sambrook, 1989)

Restriktionsendonukleasen (REs) sind Enzyme prokaryotischer Organismen, welche dazu dienen, das eigene Genom vor der Integration fremder DNA zu schützen, indem sie die fremden Moleküle durch Trennen ihrer Phosphordiesterbindungen zerstören. Die Erkennung von artfremder und eigener DNA erfolgt aufgrund unterschiedlicher Methylierungsmuster. Die Nomenklatur der REs bezieht sich auf die Organismen, aus denen sie isoliert wurden. Hierbei geben die ersten drei Buchstaben Gattung und Art an, ein eventuell vorhandener vierter Buchstabe den Serotyp der Spezies. Die römische Ziffer bezieht sich dabei auf die aus dieser Spezies bereits isolierten Enzyme.

Ein Restriktionsverdau wurde durchgeführt, indem 0,5 µg DNA in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10-fach Restriktionspuffer von 2-5 U's* Enzym pro µg DNA geschnitten wurden. Bei Doppelverdauen (z.B. EcoRI und NotI) wurden die doppelten Pufferkonzentrationen gewählt, um unspezifisches Schneiden der Enzyme (Sternaktivität) zu verhindern. Alle Ansätze wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

* Unter einem Unit (U) Enzym versteht man die Menge an Enzym, die notwendig ist, um 1 µg DNA bei 37°C vollständig zu verdauen.

8.3.5. Ligation von DNA-Fragmenten (Sgaramella et al., 1970)

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mittels einer Ligase bezeichnet man als Ligation. Bei der Standardligation wird durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen der linearisierte Vektor mit isolierten DNA-Fragmenten verknüpft, die über eine PCR hergestellt wurden oder die durch Restriktionsspaltung und anschließender Gelextraktion isoliert worden sind. Es wurde die aus dem T4-Bakteriophagen stammenden T4-Ligase verwendet. Für die Reaktion wurden äquimolare Mengen an Vektor und zu inserierendem DNA-Fragment bei 4°C über Nacht mit 5 U Enzym in Ligase-Puffer inkubiert. Mit der Hälfte eines solchen Ligationsansatzes wurden Bakterien transformiert.

9. Oberflächenfärbung von Zellen und Durchflusszytometrie

9.1. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können physikalische und biochemische Eigenschaften von Zellen auf der Grundlage von Emission und Lichtbrechung untersucht werden. Die gebräuchlichste Anwendung besteht darin, mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen, wie z. B. die Expression von Oberflächen- bzw. intrazellulären Molekülen, auf Einzelzellebene zu analysieren.

Hierfür wird eine Zellsuspension in die partikelfreie schnellfließende Trägerflüssigkeit eines Durchflusszytometers gebracht. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen einer Einzelzellsuspension an einem scharf gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Jede Zelle erzeugt Signale, indem sie Licht streut und Fluoreszenz emittiert. Die Strahlung wird über Linsen, Spiegel und Filter auf Photodetektoren geleitet und verstärkt. Solange der Laserstrahl ungehindert durch die Flusszelle geht, entsteht kein Streulicht. Quert hingegen eine Zelle den Strahl, wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut. Gemessen wird das Streulicht gewöhnlich an zwei Stellen: In Richtung des ursprünglichen Strahls (Vorwärtsstreulicht, engl. Forward Scatter, FSC) und etwa im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl (Seitwärtsstreulicht, engl. Side Scatter, SSC). Das Vorwärtsstreulicht hängt vor allem vom Zellvolumen ab. Das heißt, kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes. Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch sehr stark vom Inhalt, sprich der Granularität, einer Zelle ab. Finden sich in der Zelle sehr viele Lysosomen, dann hat sie ein großes Seitwärtsstreulicht, finden sich nur wenige, dann ist ihr Seitwärtsstreulicht gering.

Sind die Zellen mit Fluoreszenzmolekülen angefärbt, werden diese durch den Laserstrahl (Argonlaser, $\lambda=488$ nm) angeregt und geben die absorbierte Energie in Form von Licht höherer Wellenlänge wieder ab. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) haben ein ähnliches Absorptionsspektrum, können aber durch die unterschiedlichen Maxima ihrer Emissionswellenlängen [E_{max} (FITC)=520 nm, E_{max} (PE)=575 nm] dennoch separat erfasst werden. Dies ermöglicht die Messung von zwei weiteren Parametern, der Grün- und Rotfluoreszenz.

9.2. Oberflächenfärbung von Zellen

9.2.1. Färbung Peptid-gepulster Zellen (T2-, LCL-, MCF7-Zellen)

Für die Färbung Peptid-gepulster Zellen wurden zwischen 5×10^5 und 10^6 Zellen in 1 ml FCS-freiem RPMI-Medium aufgenommen und einmal gewaschen. Danach wurden sie in jeweils 1 ml FCS-freiem RPMI-Medium, in welchem zuvor das entsprechende Peptid in der für die Färbung benötigte Endkonzentration gelöst wurde, aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Zentrifugengefäß überführt. Die Zellen wurden nun für 1-1,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei 400 x g und 4°C zentrifugiert und zweimal mit jeweils 1 ml PBS/2%FCS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet mit 100 µl eines Ansatzes aus PBS/2%FCS und dem primären Antikörper in der jeweils benötigten Konzentration resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Inkubation auf Eis soll eine mögliche Zellaktivierung durch die zugesetzten Antikörper verhindern und zu einem eingeschränkten Turnover zwischen Assoziation und Dissoziation der Fab-Antikörper vom jeweiligen Antigen führen.

Anschließend wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben. Handelte es sich bei dem Primärantikörper um einen Phagen-Antikörper, wurde als sekundäres Reagenz Maus-anti-M13-Antikörper in der Konzentration 1:100 hinzugefügt; handelte es sich um Fab-Antikörper, wurde als sekundäres Reagenz Maus-anti-c-myc (9E10) mit einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. In beiden Fällen erfolgte eine Inkubation von ca. 20 Minuten. Zur weiteren Entwicklung fand eine Inkubation mit anti-Maus-Biotin, 1:200 verdünnt, für 20 Minuten statt. In einem letzten Schritt wurde der rote Farbstoff Streptavidin-PE für 10-15 Minuten in einer Konzentration von 1:200 zugesetzt.

Die Färbung der Positivkontrollen W6/32 und des anti-HLA-A*0201-Antikörpers BB7.2 (Parham et al., 1981) erfolgte über anti-Maus-Biotin und Streptavidin-PE.

Bei Färbung Peptid gepulster Zellen mit biotinylierten Fabs wurde eine direkte Entwicklung über Streptavidin-PE vorgenommen.

Während der gesamten Färbekaskade wurde nach jedem Färbeschritt zweimal mit je 1 ml PBS/2%FCS gewaschen. Nach dem abschließenden Waschschrift wurden die

Zellen zur FACS-Analyse in reinem PBS aufgenommen, wobei das Eluationsvolumen je nach FACS-Gerät und noch vorhandener Zellzahl variierte.

9.2.2. Färbung von Karzinomzelllinien

Zur Färbung der Karzinomzelllinien wurden diese, sofern es sich um adhärenzte Zelllinien handelte, mittels PBS/2 mM EDTA aus der Zellkulturflasche herausgelöst und pro Probe in 1 ml FCS-freiem RPMI oder PBS aufgenommen. Für die eigentliche Färbung wurden 5×10^5 – 1×10^6 Zellen pro Färbung verwendet, der Rest der Zellen wurde in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät.

Die Zellen wurden im ersten Schritt für 30 Minuten auf Eis mit dem primären Antikörper, in diesem Fall ein epitopspezifischer unbiotinylierter bzw. biotinylierter Fab-Antikörper, inkubiert und anschließend analog zu Kapitel 9.2.1 gewaschen. Im Falle des unbiotinylierten Fabs wurde als Sekundärantikörper anti-human-Fab-Biotin 1:100 verdünnt eingesetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Waschschrift erfolgte die Entwicklung über Streptavidin-PE 1:200 verdünnt für 10-15 Minuten auf Eis. Im Falle des biotinylierten Fabs konnte eine direkte Entwicklung über Streptavidin-PE vorgenommen werden.

Die Färbung der Positivkontrollen fand analog zu Kapitel 9.2.1 statt.

9.2.3. Blockierungsversuche auf Karzinomzelllinien

Im Speziellen wurden auf den Karzinomzelllinien Blockierungsversuche durchgeführt. Diese hatten zum Ziel, die bei den Analysen mit unbiotinylierten Fab-Antikörpern erhaltenen Ergebnisse zu validieren bzw. die Spezifität der Bindung der Fab-Antikörper auf Karzinomzellen zu untermauern. Dazu benötigte man einen Fab-Antikörper biotinyliert sowie unbiotinyliert. Die dazu verwendeten Zellen wurden wie in Kapitel 9.2.2 erläutert aufgenommen und in 1,5 ml-Eppendorf-Zentrifugengefäße überführt. Als primärer Antikörper wurde in diesem Fall ein unbiotinylierter Fab-Antikörper mit einer Konzentration von 100 – 150 µg/ml eingesetzt. Während einer Inkubationszeit von einer Stunde auf Eis sollte dieser dann das Epitop für weitere Antikörper „blockieren“. Es folgten ein Waschschrift mit 1 ml PBS/2% FCS und anschließend die Zugabe des biotinylierten Fab-Antikörpers in einer Konzentration von 25 µg/ml, sowie eine Inkubation von 45 Minuten auf Eis. Im Anschluss fanden zwei Waschschriffe mit je 1 ml PBS/2% FCS statt. Als sekundären Antikörper wurde nun Streptavidin-PE für 10 Minuten 1:200 verdünnt eingesetzt. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die

Zellen in reinem PBS aufgenommen und via Becton Dickinson™FACScan® analysiert.

Erfolgt durch den unbiotinylierten Antikörper eine erfolgreiche Blockade des Epitops auf der Zelloberfläche, sollte der anschließend eingesetzte unbiotinylierte Fab-Antikörper keine Bindungsmöglichkeit mehr haben und somit auch keine Detektion mittels Durchflusszytometrie mehr möglich sein.

10. *IFN γ -ELISPOT Assay*

10.1. Prinzip

Die Reaktivität der T-Zellen wurde im IFN γ -ELISPOT Assay überprüft. Der Test basiert darauf, dass T-Zellen, die ihre Zielzellen (Targets) erkennen, IFN γ ausschütten, welches von anti-IFN γ -Antikörpern, mit denen die Unterlage beschichtet ist, aufgefangen wird. Die Zellen werden durch Waschen entfernt und mittels einer Färbereaktion entsteht an Stelle jeder reagierenden, d.h. IFN γ sezernierenden Zelle ein violetter Spot.

10.2. Durchführung

Der IFN γ -ELISPOT Assay wurde in nitrocellulosebeschichteten 96-Well Microtiter-Platten durchgeführt. Diese wurden zuvor mit 50 μ l/well anti-humanem IFN γ Fang-Antikörper (Klon Mab 1-D1K) der Konzentration 2 μ g/ml PBS über Nacht bei 4°C ge-coatet. Am Folgetag wurde die Platte zunächst mit PBS gewaschen und anschließend zur Blockade unspezifischer Bindungen mit 10% (v/v) human AB Serum in RPMI 1640 1,5 bis 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Die im Test eingesetzten Zellen wurden geerntet, gewaschen und in serumfreiem X-VIVO 15 Medium aufgenommen. Als Effektoren wurden CD8⁺, SSX2-spezifische T-Zellen eingesetzt, als Targets dienten beladene MCF7-Zellen, sowie die Tumorzelllinien Me275 und SK-Mel-37.

Zum Beladen wurden die MCF7-Zellen in 500 μ l X-Vivo 15 mit dem entsprechenden Peptidepitop (SSX2₁₀₃₋₁₁₁, SSX2₄₁₋₄₉, Negativkontrolle: NY-ESO₁₅₇₋₁₆₅) der gewünschten Konzentration 1 bis 1,5 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss mit 120 Gy bestrahlt. Ungebundene Peptide wurden durch Waschen entfernt und die Zellen in X-Vivo 15 resuspendiert.

Im ELISPOT Assay wurden pro Well je nach Ergebnis des Vortests zwischen 2.500 und 7.000 CTLs und 3.000-4.000 Target-Zellen eingesetzt. Zur Erhöhung der Validität wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Zellen wurden 14-18h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die Zellen verworfen und die Platten sechs Mal mit PBS-Tween (0,05% Tween 20) und einmal mit PBS gewaschen. Die Reaktionen wurden mit 50 μ l des biotinylierten anti-human IFN γ Antikörpers (Klon Mab 7-B6-1-Biotin) der Konzentration 1 μ g/ml 2 Stunden bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut sechs Mal mit PBS-Tween (0,05% Tween 20) und einmal mit PBS gewaschen und 1,5 Stunden bei RT mit 50 μ l/Well Streptavidin-AP in der Verdünnung 1:2.000 in PBS inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Substrat-Lösung zugegeben. Als Substrat diente BCIP+NBT, welche als AP Konjugat Substrat Kit eingesetzt wurden. Von der Substrat-Lösung wurden 50 μ l/Well eingesetzt und die Färbereaktion nach 15-20 Minuten unter fließendem Leitungswasser gestoppt. In einem Folgeschritt wurde die Schutzfolie abgezogen und die Platte bei 37°C getrocknet. Am nächsten Tag wurden die violetten Spots mit dem BIOREADER 3000 Pro automatisch ausgezählt.

10.3. Inhibition der IFN γ Ausschüttung mittels MHC-Peptid-spezifischer Fabs auf Tumorzellen

Die Antigenpräsentation exogen mit den Peptidepitopen SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉ beladener MCF7-Zellen sowie SSX2- und HLA-A0201-positiver Tumorzelllinien (Me275, SK-Mel-37) wurde mit Hilfe epitopspezifischer Fabs blockiert. Dies diente dem Nachweis der MHC-Peptid-Spezifität der Antikörper. Zu diesem Zweck wurden exogen beladene MCF7-Zellen nach der Beladung zentrifugiert und mit den entsprechenden in X-VIVO 15 verdünnten Antikörpern der gewünschten Konzentration für 30-45 Minuten auf Eis inkubiert. Analog wurden die SSX2-exprimierenden Tumorzelllinien Me275 und SK-Mel-37 mit den Antikörpern inkubiert mit dem Unterschied, dass in diesem Fall die Peptidbeladung entfiel. Danach wurden die Zellen, wie oben beschrieben, bestrahlt, auf die einzelnen Wells des ELISPOT Assays verteilt und die entsprechende Anzahl an CTLs hinzugegeben. Das weitere Prozedere erfolgte analog der Beschreibung unter 10.2.

10.4. Inhibition der IFN γ -Ausschüttung mittels MHC-Peptid-spezifischer Fabs auf Streptavidin-gekoppelten Beads

Weiterhin wurde ein Blockversuch auf Streptavidin-gekoppelten Beads mit den „Nativ-“ und „in vitro-Bindern“ durchgeführt. Der Versuch diente der näheren Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Fabs sowie der Unterscheidung des Bindungsverhaltens zwischen „in vitro-“ und „Nativ-Bindern“. Anstelle der Target-Zellen wurden Beads in einer Konzentration von 2×10^6 Partikel/ml (hier: 4×10^5 Partikel pro 200 μ l MHC-Peptid-Komplex) eingesetzt. Die Partikel wurden mit PBS gewaschen und 15 Min. bei $1,2 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und die resuspendierten Beads mit 200 μ l des biotinylierten MHC-Peptid-Komplex in den Konzentrationen 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM 1 Stunde auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift, und die Beads wurden 60 Minuten mit 200 μ l Fab der Konzentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inkubiert unter Zugabe von 5 μ l des monoklonalen biotinylierten Maus-anti-Human CD28.2 Antikörpers. Besagter Antikörper erkennt ein 44 kD großes transmembranales Glykoprotein, welches von den meisten reifen T-Zellen, aber auch von Thymozyten und Plasmazellen präsentiert wird. CD28 ist der Ligand von CD80 und spielt eine bedeutende Rolle bei der Interaktion von T- und B-Lymphozyten. Es existieren mehrere Hinweise, dass CD28 einen gesonderten Signaltransduktionsweg initiiert und reguliert, der sich von demjenigen unterscheidet, welcher durch den T-Zell-Rezeptor-Komplex stimuliert wird. CD28 spielt als kostimulatorisches Signalmolekül eine wichtige Rolle bei der T-Zell-rezeptorabhängigen T-Zell-Aktivierung. Zudem wurde berichtet, dass die Fähigkeit von CD28-Antikörperklonen, T-Zellen zur Produktion von IL-2 anzuregen sowie die intrazelluläre Calciumkonzentration zu steigern, differiert (Nunes et al., 1993). Danach wurden jeweils 50 μ l der Suspension aus CD28.2 und Fab-MHC-Peptid-Komplexen auf die einzelnen Wells der Microtiter-Platte verteilt und 2.500 CD8⁺ T-Zellen, gelöst in einem Volumen von 50 μ l, zugesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Entwicklung des ELISPOTs erfolgte gemäß der Beschreibung unter 10.2.

11. Kinetikanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz

11.1. Prinzip

Die Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) ist generell dazu in der Lage, Informationen zu liefern über die Bindung eines Biomoleküls an einen Partner, die Affinität und Kinetik einer Interaktion sowie die Konzentration an biologisch aktiven Molekülen. Das Prinzip der Messungen ist die Detektion einer Massenzunahme, welche als RU-Wert (1 RU= eine Resonanz Unit =1 pg/mm²) angegeben wird. Grundelemente der Oberflächenplasmonresonanz sind der Sensor-Chip, der Surface Plasmon Resonance (SPR)-Detektor und ein spezielles Flusssystem.

Kinetikanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit dem Ziel durchgeführt, Aussagen über die Bindungseigenschaften eines Fab-Antikörpers gegen sein Antigen, hier einen MHC-Peptid-Komplex, zu treffen. Dazu bestimmt man unter standardisierten Bedingungen die Assoziation, Dissoziation sowie die Affinität der jeweiligen Fab-Antikörper. Die Technik der Oberflächenplasmonresonanz stellt somit eine direkte Methode dar, Bindungskonstanten zwischen einem immobilisierten (hier ein biotinylierter MHC-Peptid-Komplex) sowie einem löslichen Liganden (hier Fab-Antikörper) zu bestimmen. Sowohl die Komplexbildung als auch die Dissoziation können in Echtzeit verfolgt und anschließend direkt ausgewertet werden.

Als Sensor-Chip diente in diesem Fall ein CM5-Chip, auf welchem die Interaktionen zwischen beiden Liganden stattfand. Dieser besteht aus einem Glasträger, der auf einer Seite einen aufgedampften Goldfilm besitzt. Auf dieser dünnen Goldschicht befindet sich eine Dextranmatrix mit freien Carboxylgruppen, die der Immobilisierung des MHC-Peptid-Komplexes dienen. Folgende Abbildung stellt den Aufbau eines Sensor-Chips mit dem zugehörigen Flusssystem schematisch dar:

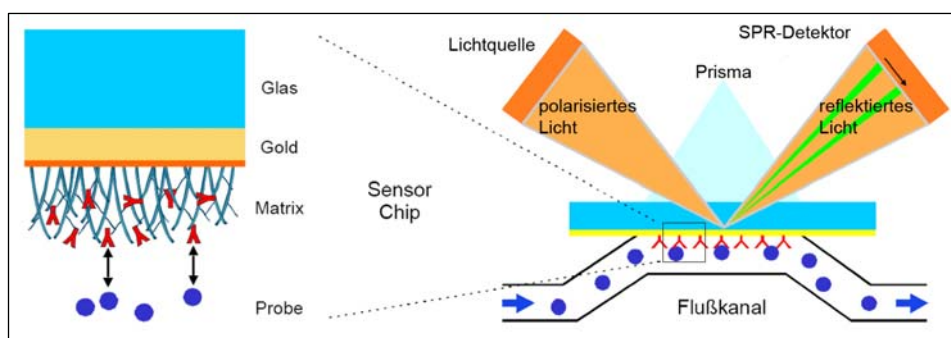


Abb. 6: Aufbau eines CM5 Sensor-Chips (links) sowie des zugehörigen Flusssystems (rechts)

Der Goldseite liegt ein Flusssystem an, über welches einerseits die Pufferlösungen sowie andererseits die jeweiligen löslichen Fab-Antikörper mit der Oberfläche – und somit auch mit dem immobilisierten MHC-Peptid-Komplex – in Kontakt treten. An der Glasseite des Chips liegt wiederum der optische SPR-Detektor, welcher, vereinfacht gesagt, die an die Dextranmatrix angelagerte Masse misst und direkt in Form eines Signalauschlages (Einheit: Response Unit, RU) darstellt.

Das Detektionsprinzip lässt sich wie folgt beschreiben: Von der Glasseite her trifft monochromatisches, polarisiertes Licht auf die Chipoberfläche, wovon ein Teil reflektiert und ein anderer Teil absorbiert wird. Trifft es jedoch in einem bestimmten Winkel auf die Oberfläche, so kommt es zu einer Totalreflexion. Dieser Winkel ist für jede sich auf der Chipoberfläche befindende Masse charakteristisch und zur Beladung der Chipoberfläche proportional. Im Bereich der Totalreflexion kommt es auf der Goldseite des Chips zur Induktion elektromagnetischer Wellen, welche schließlich mit dem reflektierten Strahl in Resonanz stehen. Diese elektromagnetischen Feldkomponenten treten aus der Goldschicht heraus. Dort können sie von immobilisierten Liganden absorbiert oder phasenverschoben werden. Dies wirkt sich schließlich wieder auf den Totalreflexionswinkel aus. Durch Anregung der Oberflächenenergie auf der Rückseite der Goldfolie kommt es ferner zur Bildung von Elektronendichte-Wellen, auch Oberflächenplasmon genannt.

Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der Änderung des Reflexionswinkels – und somit auch der Änderung der Masse auf der Chipoberfläche – erhält man schließlich kinetische Informationen über den Bindungsvorgang.

11.2. Durchführung

Die Immobilisierung des MHC-Peptid-Komplexes wurde nach folgendem Prinzip durchgeführt: Die Carboxylgruppen der Dextranmatrix des CM5-Chips mussten in einem ersten Schritt aktiviert werden. Dies geschah mit Hilfe der beiden Substanzen 0,2 M N-Dimethylaminopropyl-carbodiimid (EDC) sowie 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS), injiziert mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{l/min}$: EDC reagiert mit den Carboxylgruppen der Dextranmatrix zu einem O-Harnstoff-Derivat, unterstützt wurde diese Reaktion im Sinne einer Stabilisierung durch NHS. Das entstandene Produkt ist wiederum elektrophil, so dass eine Reaktion mit nukleophilen Aminen begünstigt wird. In diesem Fall wurde Streptavidin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml (in 10 mM Na-

Acetat pH 4,5) kovalent und unter EDC-Freisetzung an die Dextranmatrix gebunden. Abschließend wurden die restlichen freien Carboxylgruppen mit 1 M Ethanolaminhydrochlorid geblockt.

In einem zweiten Schritt wurde mittels einer Streptavidin-Biotin-Bindung der MHC-Peptid-Komplex immobilisiert. Hierbei musste darauf geachtet werden, bei den verschiedenen MHC-Peptid-Komplexen jeweils etwa die gleiche Menge zu immobilisieren. Ferner wurde bei vier Flusszellen in der Regel eine nicht mit einem MHC-Peptid-Komplex beladen, diese diente dann als Referenzzelle.

Nach Zugabe der MHC-Peptid-Komplexe und Stabilisierung dieser mit jeweils 10 μ l 1 M NaCl kann in einem dritten Schritt mit der Zugabe der Fab-Antikörper, gelöst in HBS-EP Puffer begonnen werden.

Nach Zugabe des Fab-Antikörpers erfolgte ausgehend von der Basislinie ein Anstieg der Masse auf der Chipoberfläche, der sich im Sensorgramm als RU-Zunahme äußerte. Dies wird als Assoziationsphase bezeichnet. Nach Ende der Injektion kommt es zu einer mehr oder weniger schnellen Dissoziation vom immobilisierten MHC-Peptid-Komplex, die abhängig ist vom Bindungsvermögen des jeweiligen Fab-Antikörpers. Ist nach einer bestimmten Dissoziationszeit die Basislinie nicht wieder erreicht, was bedeutet, dass noch Fab-Antikörper an den MHC-Peptid-Komplex gebunden sind, so muss eine chemische Regeneration des MHC-Peptid-Komplexes erfolgen. Im Idealfall wird hierbei alleine der Fab-Antikörper entfernt und die gesamte Menge des MHC-Peptid-Komplexes auf der Chipoberfläche belassen. Eine erneute Injektion soll erst nach Rückkehr zur Basislinie erfolgen.

Im Sensorgramm stellt sich dies wie folgt dar:

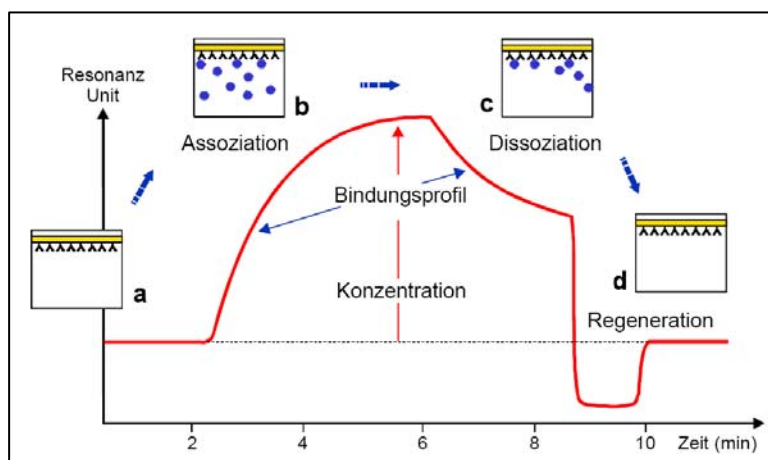


Abb. 7: Darstellung eines Sensorgramms; a) Basislinie; b) Probeninjektion; Bindung und Signalanstieg; c) Basislinie nach Regeneration

Ausgewertet wurden schließlich die eigentlichen Bindungskurven abzüglich der Referenzkurve, welche nur Streptavidin und keinen MHC-Peptid-Komplex enthielt. Die Bestimmung der Assoziations-, Dissoziations- und Affinitätsparameter erfolgte mittels eines Langmuir 1:1 Bindungsmodells.

12. Fluoreszenzmikroskopie

Diese Methode kann einerseits dazu genutzt werden, mit Hilfe von Antikörpern gegen intrazelluläre Proteine, deren Expression zu quantifizieren. Andererseits ist es möglich durch Antikörper gegen MHC I-restringierte Epitope das Niveau und die Variation der Präsentation tumorassoziierter Antigene auf der Zelloberfläche zu detektieren. Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie, die mit Hilfe der üblichen Färbetechniken problemlos Moleküle in einer Konzentration von ca. 2000 Molekülen eines Zielantigens/Zelle (nach Optimierung max. Sensitivität ca. 100 Moleküle/Zelle) detektieren kann (Mavrangelos et al., 2004; Zola, 2004), besteht im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit auch eine sehr geringe Präsentation, die unterhalb der Nachweisgrenze eines FACS-Gerätes liegt, zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass ein unspezifischer Hintergrund der Antikörper in der Fluoreszenzmikroskopie im Gegensatz zur Durchflusszytometrie sehr gut von einer spezifischen Membranfärbung unterscheidbar ist.

Die im Folgenden beschriebenen Fluoreszenzfärbungen wurden alle an vitalen Zellen vorgenommen, um sowohl die Zellen als auch deren Membranoberfläche möglichst wenig zu verändern.

12.1. Membranfärbungen von Tumorzellen

Am Tag vor der Färbung wurden je nach Wachstumsverhalten der einzelnen Tumorzelllinien zwischen 5×10^4 (SK-Mel-37) und 1×10^5 Zellen in einer sterilen 12-well-Platte auf einem sterilen Deckglas in 500 μ l RPMI 1640 (10% FCS, 2 mM L-Glutamin) unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin (1:200) für etwa 20 Stunden ausgesät. Im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte waren die Zellen bis zum nächsten Tag auf dem Deckglas adhärent.

Am Folgetag wurde zunächst das Medium vorsichtig von den Zellen entfernt und diese anschließend einmal mit PBS/FCS (4%, 4°C) gewaschen. Die weitere Färbung erfolgte komplett auf Eis mit vorgekühlten Färbereagenzien, welche jeweils in PBS/4% FCS verdünnt wurden, damit sich die Zellen nicht vom Deckglas ablösten.

Um alle Zellen gleichmäßig mit Antikörper zu bedecken, wurde ein Färbevolumen von 300 µl verwendet. Nach jedem Färbeschritt wurden die Zellen 3 Mal für 5 Minuten mit PBS/4% FCS gewaschen.

Der Primärantikörper, ein biotinylierter Fab gegen das Epitop SSX2₄₁₋₄₉ bzw. SSX2₁₀₃₋₁₁₁, wurde in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Streptavidin-PE für 15 Minuten gefärbt.

Als Positivkontrolle diente ein Hybridomüberstand des anti-HLA-A*0201-Klons BB7.2. Dieser wurde 1:2 verdünnt eingesetzt und die Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung über biotinyliertes anti-Maus-Ig, das 1:200 verdünnt eingesetzt wurde, für 15 Minuten. Zuletzt wurden die Zellen mittels Streptavidin-PE für 15 Minuten gefärbt.

Weiterhin ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen, eine sog. „Doppelfärbung“ zu etablieren, in der es erstmalig möglich war, die simultane Expression zweier verschiedener Epitope eines tumorassoziierten Antigens darzustellen. Hierzu wurde ein epitopspezifischer Antikörper in seiner biotinylierten Form (VIE1-b), der andere in seiner unbiotinylierten Form (Fab3) eingesetzt. Damit sich die Zellen nicht aufgrund der vielen Wasch- und Färbeschritte vom Deckglas ablösen, erfolgte zunächst eine Vorinkubation des unbiotinylierten Fabs mit dem murinen Antikörper anti-c-myc, Klon 9E10, für 30 Minuten auf Eis. Dieser wurde 1:10 verdünnt in einer Endkonzentration von 70 µg/ml eingesetzt. Im Anschluss wurde die Doppelfärbung auf den Zellen unter simultanem Einsatz des 9E10-gekoppelten Fab3 und des VIE1-b für 45 Minuten durchgeführt. Beide Antikörper wurden mit 50 µg/ml in gleicher Endkonzentration verwendet. Danach wurde der unbiotinylierte Antikörper über anti-Maus-FITC 1:100 verdünnt für 15 Minuten entwickelt. Der biotinylierte Antikörper wurde in einem letzten Schritt über den Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin-PE, ebenfalls 1:100 verdünnt, für 15 Minuten gefärbt.

Die Membranfärbung wurde schließlich mittels eines invertierten Fluoreszenzmikroskops visualisiert. Dies ist ein Mikroskop, bei dem die Objektive von unten auf die Zellkulturplatten eingestellt werden weil man durch den Deckel der Zellkulturplatten sonst nicht nahe genug an das Objekt heranfahren und somit nicht fokussieren kann. Als Leuchtquelle diente ein Polychrome IV Monochromator (TILL Photonics). Die An-

regung der Fluorophore erfolgte im Fall von R-Phycoerythrin mit Licht der Wellenlänge 565 nm, im Fall von Fluorescein-Isothiocyanat mit 492 nm.

R-Phycoerythrin wurde unter Verwendung eines TRITC-Filtersatzes detektiert. Dieser besteht aus einem 540/25 nm Anregungsfilter, der nur das Exzitationslicht passieren lässt, einem dichroischen Teilerspiegel (DM 565), welcher das kurzwellige Anregungslicht reflektiert und langwelliges Emissionslicht ab 565 nm passieren lässt und einem 605/55 nm Emissionsfilter, der nur Licht der Bandbreite 515-555 nm passieren lässt. Zur Darstellung von Fluorescein-Isothiocyanat wurde ein FITC-Filtersatz verwendet mit einem 480/30 nm Anregungsfilter, einem dichroischen Teilerfilter (DM 505) und einem 535/40 nm Emissionsfilter. Das Fluoreszenzlicht wurde mit Hilfe einer EM-CCD Kamera (electron-multiplication charge-coupled device camera) unter Verwendung der TILL Vision Auswertungssoftware (TILL Photonics) aufgefangen. Die Bilder wurden anschließend mit ImageJ weiterbearbeitet.

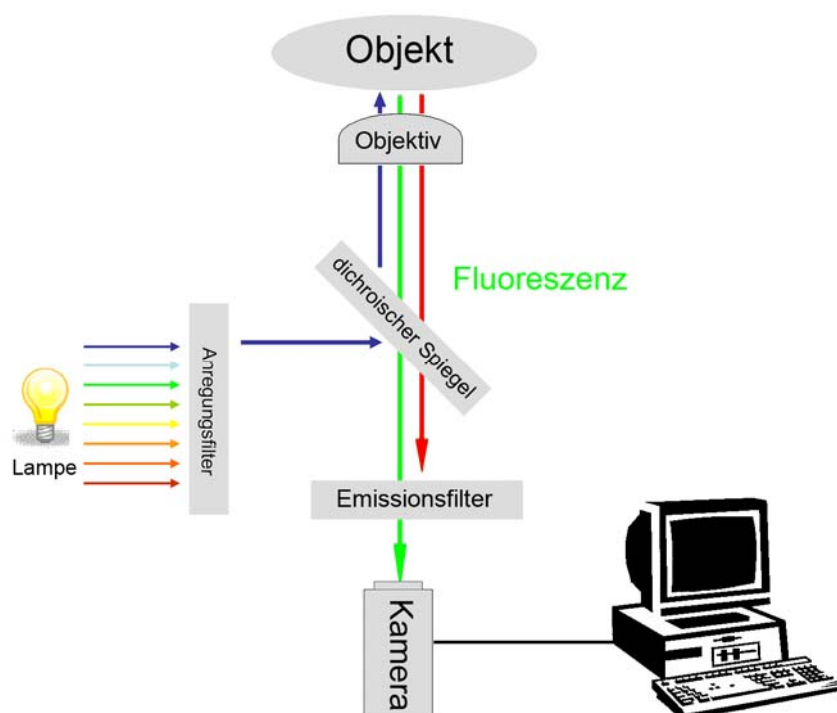


Abb. 8: Schematische Darstellung eines invertierten Mikroskops

12.2. Intrazelluläre Färbungen verschiedener Tumorzelllinien

Die Zellen wurden analog der Beschreibung unter 12.1 am Vortag der Färbung ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zuerst mit 0,5% Saponin gelöst in

PBS/4% FCS für 30 Minuten permeabilisiert und danach einmal gewaschen. Alle weiteren Färbeschritte erfolgten auf Eis in PBS/4 %FCS unter Zusatz von 0,1% Saponin. Nach jedem Färbeschritt wurden die Zellen 3 Mal für 5 Minuten mit PBS/4% FCS/0,1 % Saponin gewaschen.

Als Primärantikörper diente der murine monoklonale anti-SSX-Antikörper E3AS. Der Antikörper wurde 1:200 verdünnt für 30 Minuten auf Eis mit den Zellen inkubiert. In einem nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper anti-Maus-Ig-Biotin 1:200 verdünnt für 20 Minuten zugesetzt. Schließlich wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin-PE 1:200 verdünnt für 15 Minuten gefärbt.

Die Detektion von R-Phycoerythrin erfolgte wie in Kapitel 12.1 beschrieben unter Verwendung eines TRITC-Filtersatzes.

13. *Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion*

13.1. Prinzip (Belyavsky et al., 1989)

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (*RT-PCR*) ist die Kombination aus zwei Methoden der Molekularbiologie, um die Expression von spezifischen Genen in Zellen, Geweben oder Blutseren nachzuweisen: die Nutzung der Reversen Transkriptase und die Polymerase-Kettenreaktion. Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, muss zunächst die abgelesene RNA amplifiziert werden. Dies geschieht mittels einer modifizierten viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der sog. reversen Transkriptase (RT), mit deren Hilfe es möglich ist, RNA in cDNA umzuschreiben. Die cDNA kann im Anschluss als Ausgangsmaterial in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren.

13.2. RNA-Extraktion aus Zellkulturen mittels RNeasy[®] Mini Kit

Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe der RNeasy[®] Spinsäulen-Technologie gemäß des RNeasy Minihandbooks (Qiagen). Es handelt sich um eine sehr effiziente Methode der RNA-Gewinnung, bei der die sog. Silica-Membrantechnologie zur Anwendung kommt. Ein großer Vorteil ist, dass die gereinigte RNA frei von Kontaminationen wie beispielsweise Chloroform oder Phenol ist, die im Rahmen der nachfolgenden Amplifikationsreaktionen inhibitorisch auf die eingesetzten Enzyme wirken könnten. Um eine optimale RNA-Ausbeute und -Reinheit zu erzielen, ist es wichtig, die korrek-

te Anzahl an Zellen einzusetzen. Hierbei gilt es zu beachten, dass der RNA-Gehalt zwischen den einzelnen Zellen stark variieren kann. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde bei allen RNA-Isolierungen die Gesamt-RNA aus 2×10^6 Zellen gewonnen. Die Tumorzellen wurden alle zum Zeitpunkt des jeweiligen Experiments geerntet, bei 300 x g zentrifugiert und pelletiert. Anschließend wurde der Überstand sorgfältig entfernt um eine Inhibition der Lyse durch noch verbliebenes Zellkulturmedium zu vermeiden. Das Zellpellet wurde zunächst in Stickstoff schockgefrostet und dann bei -70°C bis zur Reinigung gelagert.

Am Tag der Extraktion wurden die Zellen zunächst aufgetaut. Parallel hierzu wurden 10 µl β-Mercaptoethanol mit 1 ml RLT-Puffer vermischt. In einem nächsten Schritt wurden die Zellen durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer lysiert und die Probe durch Pipettieren auf dem QIAshredder (Qiagen; Hilden, Germany) homogenisiert. Danach wurde das Lysat auf eine Collection-Tube gesetzt und für 2 Minuten bei 19.000 x g zentrifugiert. In einem nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 360 µl 70% Ethanol, dann wurde die Probe erneut gut durchmischt. Im Anschluss wurden 700 µl der Probe – inklusive des Präzipitats, welches sich möglicherweise bildete – auf eine RNeasy-Spinsäule transferiert, diese auf ein 2 ml Sammelröhrchen gesetzt und 30 Sekunden bei 19.000 x g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde nun verworfen, 700 µl PW1-Puffer pro RNeasy-Spinsäule zugesetzt und erneut 30 Sekunden bei 19.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt diente dazu, die Membran der Spinsäule zu waschen. Der Überstand wurde erneut verworfen, die RNeasy-Säule in ein neues 2 ml Sammelröhrchen transferiert, 500 µl RPE-Puffer zugesetzt und wieder für 30 Sekunden bei 19.000 x g zentrifugiert. Der vorherige Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, wobei jedoch eine Zentrifugation für 2 Minuten erfolgte. Um die RNA im letzten Schritt zu eluieren, wurde die RNeasy-Säule wiederum auf ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen gesetzt, 40 µl RNase-freies H_2O auf die RNeasy-Membran pipettiert und ein letztes Mal für 1 Minute bei 19.000 x g zentrifugiert.

Konzentration und Reinheit der RNA wurden photometrisch bestimmt. Hierbei wurde die Absorption (optische Dichte = OD) der Nukleinsäurelösung bei 260 nm gemessen. Zudem wurde der Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ bestimmt, welcher den Grad der Kontamination mit Protein widerspiegelt und größer als 1,5 sein sollte.

Das Volumen, welches 2 µg RNA enthält, wurde für die Herstellung von cDNA entnommen und zwecks einfacherem Handling mit H₂O_{dest.} auf ein einheitliches Volumen von 5 µl aufgefüllt.

13.3. Herstellung von cDNA aus mRNA

Mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase kann die mRNA in die dazu komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben werden. Hierzu existieren prinzipiell zwei verschiedene Verfahren: Einmal das sog. Ein-Schritt-Verfahren, bei dem genspezifische Primer benötigt werden, und zum anderen das sog. Zwei-Schritt-Verfahren, das unter Einsatz von Oligo(dT) Primern, Random Primern oder genspezifischen Primern möglich ist.

Zur Herstellung von cDNA kam im vorliegenden Fall aufgrund der höheren Flexibilität bezüglich der Primerwahl und des Amplifikationssystems das Zwei-Schritt-Verfahren zur Anwendung. Durch Verwendung eines oligo(dT)-Primers, der an den polyA-Schwanz der mRNAs bindet, ist es möglich, nur die mRNA, nicht jedoch tRNA oder rRNA aus der eingesetzten Gesamt-RNA in cDNA umzuschreiben.

Pro Probe wurde ein Ansatz aus folgenden Komponenten hergestellt:

- 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (500 µg/ml)
- 1 µl dNTP Mix (10 mM)
- 5 µl Gesamt-RNA (2 µg)
- 6 µl H₂O_{dest.}

Gesamt: 13 µl

Das Gemisch wurde anschließend für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, anschließend schnell auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde der cDNA-Synthesemix pipettiert:

- 4 µl 5 x First-Strand-Puffer
- 2 µl DTT (0,1 M)

Zu jedem RNA-Ansatz wurden 6 µl des cDNA-Synthese-Mix pipettiert, der Inhalt vorsichtig gemischt und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde je RNA/Primer-Mix 1 µl SuperScript™ II RT (200 U/µl) zugefügt, vorsichtig gemischt und 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Durch eine weitere Inkubation für 15 Minuten bei

70 °C wurde die Reaktion inaktiviert. Die cDNA konnte nun als Matrize zur Amplifikation eingesetzt werden.

13.4. PCR

Das genaue Prinzip der PCR ist unter Kapitel 7.2.6.1 erläutert. Im Folgenden wird nur auf die einzelnen Bedingungen eingegangen, falls als Ausgangspunkt der PCR cDNA eingesetzt wurde.

Pro Probe wurde ein PCR-Reaktionsgemisch bestehend aus folgenden Komponenten verwendet:

- 2,5 µl 10 x PCR Puffer
 - 1,5 µl MgCl₂ (50 mM)
 - 0,5 µl dNTP Mix (10 mM)
 - 1 µl Forward Primer (10 µM)
 - 1 µl Reverse Primer (10 µM)
 - 0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
 - 0,5 µl cDNA (50 ng)
 - 17,9 µl H₂O_{dest.}
-

Gesamt: 25 µl

Die DNA-Amplifikationen fanden unter folgenden Bedingungen statt:

- Denaturierung für 12 Minuten bei 95°C
 - Denaturierung für 45 Sekunden bei 95°C
 - Annealing für 30 Sekunden bei 60°C bzw. 65°C*
 - Elongation für 1 Minute bei 72°C
- } 35 Zyklen

Die Annealing-Temperatur lagen für SSX1, 3, 4, 6, 7 und 9 bei 60°C. Für die Amplifikation von SSX2, 5 und 8 wurde eine höhere Annealing-Temperatur von 65°C gewählt, um eine unspezifische Bindung der Primer zu verhindern.

Folgende genspezifische Primer kamen für die einzelnen SSX-Gene zum Einsatz:

- **SSX 1A (5')**: 5'-CTAAAGCATCAGAGAAGAGAAGC
- **SSX 1B (3')**: 5'-AGATCTCTTATTAATCTTCTCAGAAA
- **SSX 2A (5')**: 5'-GTGCTCAAATACCAGAGAAGATC
- **SSX 2B (3')**: 5'-TTTTGGGTCCAGATCTCTCGTG
- **SSX 3A (5')**: 5'-GGAAGAGTGGGAAAAGATGAAAGT

- **SSX 3B (3')**: 5'-CCCCTTTTGGGTCCAGATATCA
- **SSX 4A (5')**: 5'-AAATCGTCTATGTGTATATGAAGCT
- **SSX 4B (3')**: 5'-GGGTCGCTGATCTCTTCATAAAC
- **SSX 5A (5')**: 5'-GTTCTCAAATAACCACAGAAGATG
- **SSX 5B (3')**: 5'-CTCTGCTGGCTTCTCGGGCG
- **SSX 6A (5')**: 5'-CTAAAGCATCAGAGAAGAGAAGC
- **SSX 6B (3')**: 5'-TTTTGGGTCCAGATCTCTCGTG
- **SSX 7A (5')**: 5'-TTTGCAAGGAGACCTAGGGC
- **SSX 7B (3')**: 5'-GGGGAGT TACTCGTCGTCTTCT
- **SSX 8A (5')**: 5'-AAAGAGACCCAGG GATGATGA
- **SSX 8B (3')**: 5'-CTCTTCATAAATCACCAGCTGG
- **SSX 9A (5')**: 5'-AGACAACGACTGTGCAAAGAGAG
- **SSX 9B (3')**: 5'- TGTGAATCTTCTCAGAAGTATTTGCTC

Ergebnisse

1. Zusammenfassung der Selektionsergebnisse

Am Beginn des Projektes standen die Selektion, Generierung und Charakterisierung von Fab-Antikörpern, welche die beiden immunogenen Epitope des Tumorpeptids SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉ im Kontext von HLA-A*0201 erkennen. Da die Selektionen gegen SSX2₄₁₋₄₉ von Herrn Dr. Carsten Zwick durchgeführt wurden, sind die daraus resultierenden Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit erst von dem Zeitpunkt ab dargestellt, ab dem die Versuchsergebnisse eigenhändig erhoben wurden. Herr Dr. Carsten Zwick hat mir die von ihm generierten Antikörper freundlicherweise im weiteren Verlauf der Arbeit zur Verfügung gestellt.

Im Folgenden sind somit die Ergebnisse der Selektionen gegen das Tumorpeptid SSX2₁₀₃₋₁₁₁ dargestellt. Es wurden insgesamt drei Selektionsrunden durchgeführt, wobei pro Runde die Konzentration des MHC-Peptid-Komplexes reduziert wurde. Ziel war es, dass nach der dritten Selektionsrunde Antikörper mit möglichst hoher Spezifität und Affinität für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen. Vor und nach jeder Selektionsrunde wurden jeweils die In- und Output-Konzentration bestimmt, welche im Folgenden aufgelistet sind:

	1. Runde	2. Runde	3. Runde
Input [cfu/ml]	$2,68 \times 10^{13}$	$6,68 \times 10^{13}$	$5,32 \times 10^{13}$
Output [cfu/ml]	$3,40 \times 10^7$	$2,32 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
Output/Input	$1,27 \times 10^{-6}$	$3,47 \times 10^{-6}$	$1,88 \times 10^{-5}$

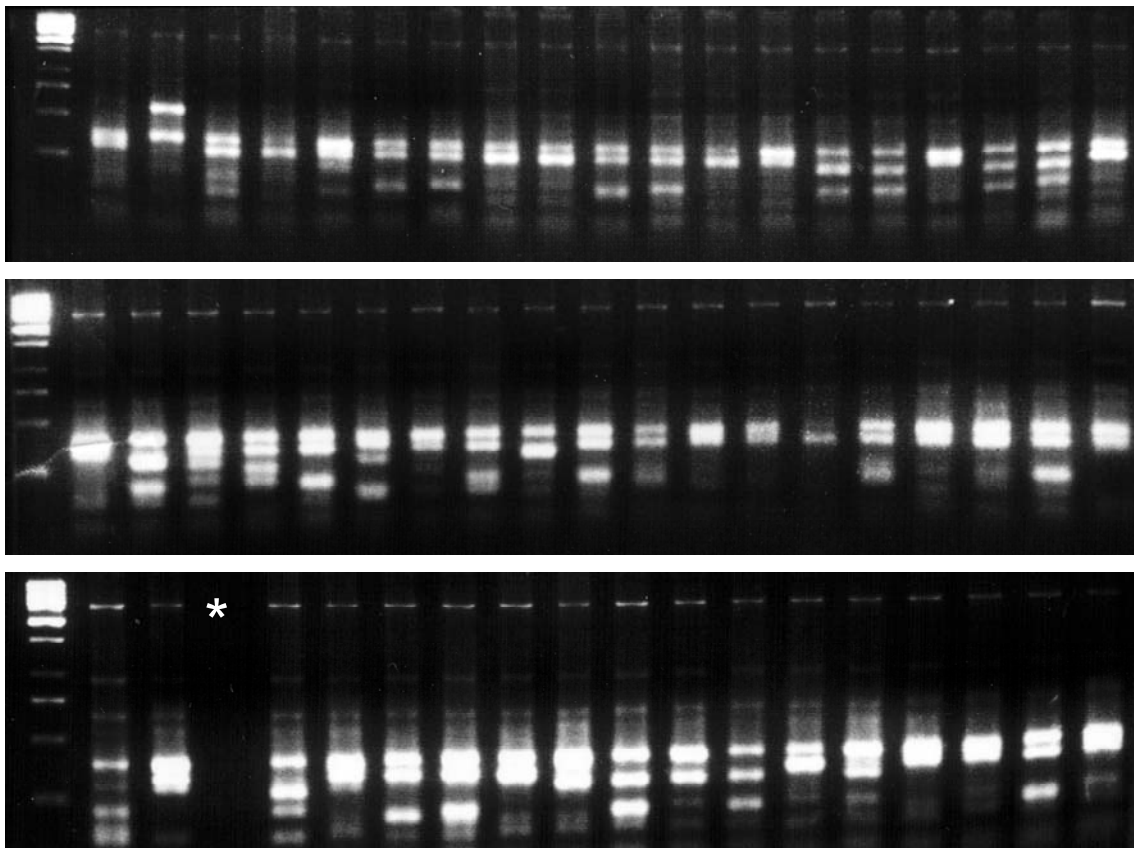
$\text{„Anreicherung“} = \frac{\text{Output 3. Runde} / \text{Input 3. Runde}}{\text{Output 1. Runde} / \text{Input 3. Runde}} = 14,82$

Nach den Selektionen erfolgte ein erstes Screening, in dem Phagenüberstand aus einem Phagen-Rescue von 89 zufällig aus der zweiten und dritten Runde gepickten Klonen, in einer ELISA gegen den relevanten und einen irrelevanten MHC-Peptid-

Komplex als Kontrolle getestet wurden. In diesem Fall kam der MHC-Peptid-Komplex CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ / HLA-A*0201 als Kontrollkomplex zur Anwendung.

Als positives Signal wurde gewertet, wenn die Absorption bei 450 nm den dreifachen Hintergrundwert überschritt. Unter Anwendung dieses Kriteriums konnten 83 epitopspezifische Binder identifiziert werden, welche spezifisch gegen den relevanten MHC-Peptid-Komplex SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 reagierten. Zwei Klone erkannten sowohl den Ziel-Komplex als auch den Kontroll-Komplex, woraus zu schließen ist, dass es sich dabei mit einiger Sicherheit um sog. „panspezifische“ Binder gegen HLA-A*0201 handeln musste. Die verbleibenden 4 Klone lieferten auf keinem der beiden Komplexe ein Signal.

Bevor die 83 selektionierten epitopspezifischen Klone jedoch Gegenstand weiterer Beobachtungen wurden, sollte zunächst mittels PCR und anschließendem Restriktionsverdau mit BstNI deren Diversität sichergestellt werden. Die daraus resultierenden DNA-Fragmente unterschiedlicher Klone wurden in einem 1,5%-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und deren Bandenmuster, sog. Fingerprints, mit Ethidiumbromid visualisiert:



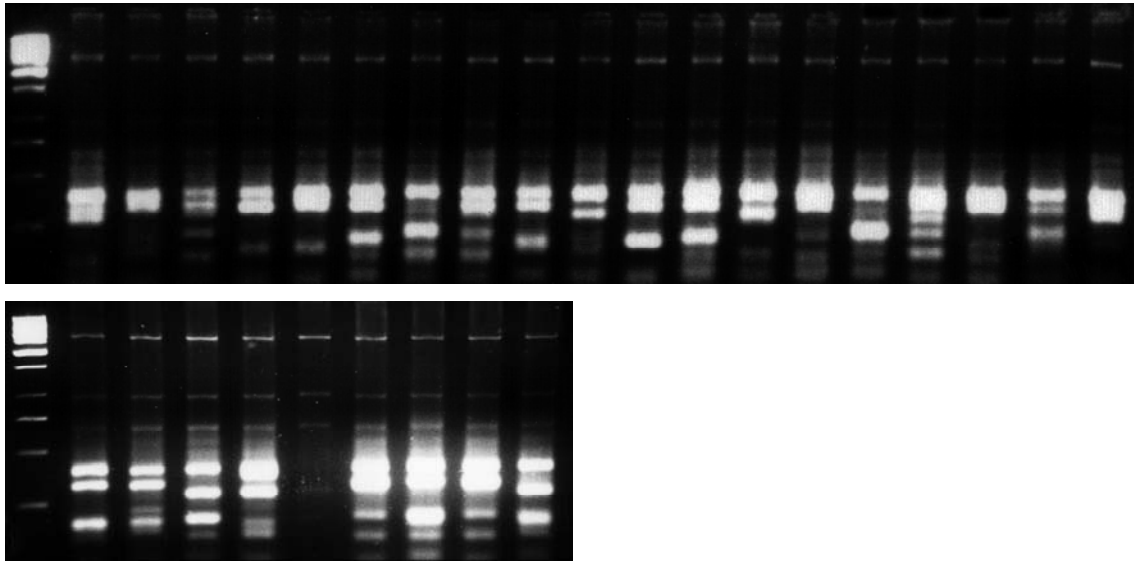


Abb. 9: Fingerprints der 83 selektionierten Klone; links außen 1kb-Längenmarker; *Negativkontrolle

Aus den insgesamt 83 Klonen wurden anhand des typischen Bandenmusters der Fingerprints 16 verschiedene Klone ausgewählt, welche den Ausgangspunkt der weiteren Arbeit darstellten. In einem nächsten Schritt wurde zur Sicherstellung einer monoklonalen Kultur ein 2-maliger Dreißenausstrich der 16 Klone angefertigt. Es folgten eine erneute PCR und ein Fingerprint zweier zufällig gepickter Klone des 2. Ausstrichs und des jeweils entsprechenden Klons aus der Masterplatte. Um die Diversität der einzelnen Klone endgültig zu verifizieren, wurden alle 16 Klone zusätzlich sequenziert. Hierbei zeigten sich insgesamt 3 Klone mit einer Lambda-Kette und 13 Klone mit einer Kappa-Kette, deren Gene und Aminosäuresequenzen der CDR3-Regionen im Folgenden näher aufgeführt sind:

Tab. 5: V-, J-, D-Gen und Aminosäuresequenz der CDR3-Region der Schwereketten der untersuchten Klone

Klonname	V-Gen	J-Gen	D-Gen	CDR3
IIB1	IGVH1-24*01 (94,44%)	IGJH4*02 (81,25%)	IGDH6-19*01	ATLKYSSGWQTLDY
IIC2	IGVH1-24*01 (95,14%)	IGJH4*02 (83,33%)	IGDH2-8*02	ATMALEAFDY
IIG2	IGVH1-24*01 (96,18%)	IGJH4*02 (75%)	IGDH1-26*01	ATGGVGATLG DY
IIH1	IGVH1-24*01 (95,14%)	IGJH4*02 (77,08%)	IGDH6-19*01	ATVTQQWLVDY

Klonname	V-Gen	J-Gen	D-Gen	CDR3
IIIB1	IGVH1-24*01 (94,1%)	IGJH1*01 oder IGJH4*02 oder IGJH4*03 (81,25%)	IGDH2-15*01	ATGSFDY
IIID2	IGVH1-24*01 (94,1%)	IGJH4*02 (91,67%)	IGDH3-10*01	ATDSAYHYFDY
VIC1	IGVH1-24*01 (95,83%)	IGJH4*02 oder IGJH4*03 (79,17%)	IGDH1-26*01	ATKSGSLDY
VIE1	IGVH1-24*01 (95,49%)	IGJH4*02 (83,33%)	IGDH6-6*01	ATASAPDLKFDY
VIIB1	IGVH1-24*01 (95,49%)	IGJH4*02 (77,08%)	IGDH6-19*01	ATDSAVALDY
VIID2	IGVH1-24*01 (95,49%)	IGJH4*02 (83,33%)	IGDH6-6*01	ATASAPDLKFDY
VIIIA2	IGVH1-24*01 (95,83%)	IGJH4*02 (83,33%)	IGDH3-9*01	ATLTGLFDY
VIIIE1	IGVH1-24*01 (94,79%)	IGJH4*02 oder IGJH4*03 (83,33%)	IGDH6-13*01	ATPHGIAATGVFDY
IXG2	IGVH1-24*01 (95,83%)	IGJH4*02 (83,33%)	IGDH3-9*01	ATLTGLFDY
XA1	IGVH1-24*01 (94,79%)	IGJH5*02 (84,31%)	IGDH6-19*01	VVSRGSRFDP
XE1	IGVH1-24*01 (94,79%)	IGJH4*02 (77,08%)	IGDH1-26*01	ATEESGSYNY
XIA2	IGHV3-30*04 oder IGHV3-30*11 oder IGHV3-30-3*02 (96,53%)	IGHJ3*02 (92%)	IGDH6-13*01	ARAHSSGWYDAFDI

Die Angaben in Klammern beziehen sich auf den Prozentwert der Übereinstimmung mit dem verglichenen Gen; rot: Klone mit Lamda-Kette; die Klone VIIIA2 und IXG2 sowie VIE1 und VIID2 besitzen identische Schwerketten und unterscheiden sich lediglich in ihren Leichtketten

Tab. 6: V-, J-Gene und Aminosäuresequenz der CDR3-Region der Leichtkette der untersuchten Klone

Klonname	V-Gen	J-Gen	CDR3
IIB1	IGVκ3-20*01 (97,52%)	IGJκ2*01 (100%)	QQYGSSPPY
IIC2	IGVκ2-28*01 oder IGVκ2D-28*01 (96,26%)	IGJκ3*01 (97,37%)	MQGTHWPFT
IIG2	IGVκ2-30*01 (97,62%)	IGJκ2*01 (97,37%)	MQGSHWPYT
IIH1	IGVκ2-28*01 oder IGVκ2D-28*01 (98,98%)	IGJκ2*01 oder IGJκ2*02 (97,22%)	MQALQTPLT
IIIB1	IGVκ3-20*01 (89,01%)	IGJκ2*02 (86,11%)	HQYVNSPRT
IIID2	IGVκ3-15*01 (93,19%)	IGJκ1*01 (88,89%)	QQYRTWPLA
VIC1	IGVλ3-19*01 (92,83%)	IGJλ2*01 oder IGJλ3*01 (92,11%)	ESRDTSGQHYVI
VIE1	IGVλ3-1*01 (96,42%)	IGJλ2*01, oder IGJλ3*01 (100%)	QAWDSSTVV
VIIB1	IGVκ3-15*01 (94,62%)	IGJκ1*01 (94,74%)	QQYKHWPR
VIID2	IGVκ2D-29*01 (99,66%)	IGJκ2*01 (100%)	MQSIQLPYT
VIIIA2	IGVκ3-20*01 (96,81%)	IGJκ1*01 (94,59%)	QQYGSSPLA
VIIIE1	IGVκ2-28*01 oder IGVκ2D-28*01 (99,66%)	IGJκ3*01 (100%)	MQALQTPFT
IXG2	IGVκ2-28*01 oder IGVκ2D-28*01 (98,64%)	IGJκ1*01 (97,37%)	MQALQTPRT
XA1	IGVκ2-28*01 oder IGVκ2D-28*01 (99,66%)	IGJκ2*01 (100%)	MQALQTPYT
XE1	IGVλ3-19*01 (97,85%)	IGJλ2*01 oder IGLJλ3*01 oder IGLJλ3*02 (93,75%)	HSRDSSDNQL
XIA2	IGVκ3-20*01 (93,62%)	IGJκ4*01 (94,74%)	QQYESSPPRLT

2. Bestimmung der Spezifität der selektierten Klone

2.1. Produktion von Fab-Antikörpern

Die Produktion der löslichen Fab-Antikörper erfolgte gemäß dem im Teil „Material und Methoden“ dargelegten Protokoll. Nach erfolgter Reinigung wurde die Reinheit der produzierten Proteine überprüft; dazu wurden diese jeweils mit einem reduzierenden und einem nicht-reduzierenden Ladepuffer nach Denaturierung bei 96°C für ca. 5 Minuten auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Durch das im reduzierenden Ladepuffer enthaltene β -Mercaptoethanol kommt es zur Aufspaltung der Disulfidbrücke und somit zur Trennung von Leicht- und Schwereketten des Fab-Antikörpers. Im SDS-Gel erkennt man dies daran, dass der Fab-Antikörper mit intakter Disulfidbrücke bei ca. 50 kDa, die Leicht- und Schwereketten bei ca. 20-30 kDa detektiert werden:

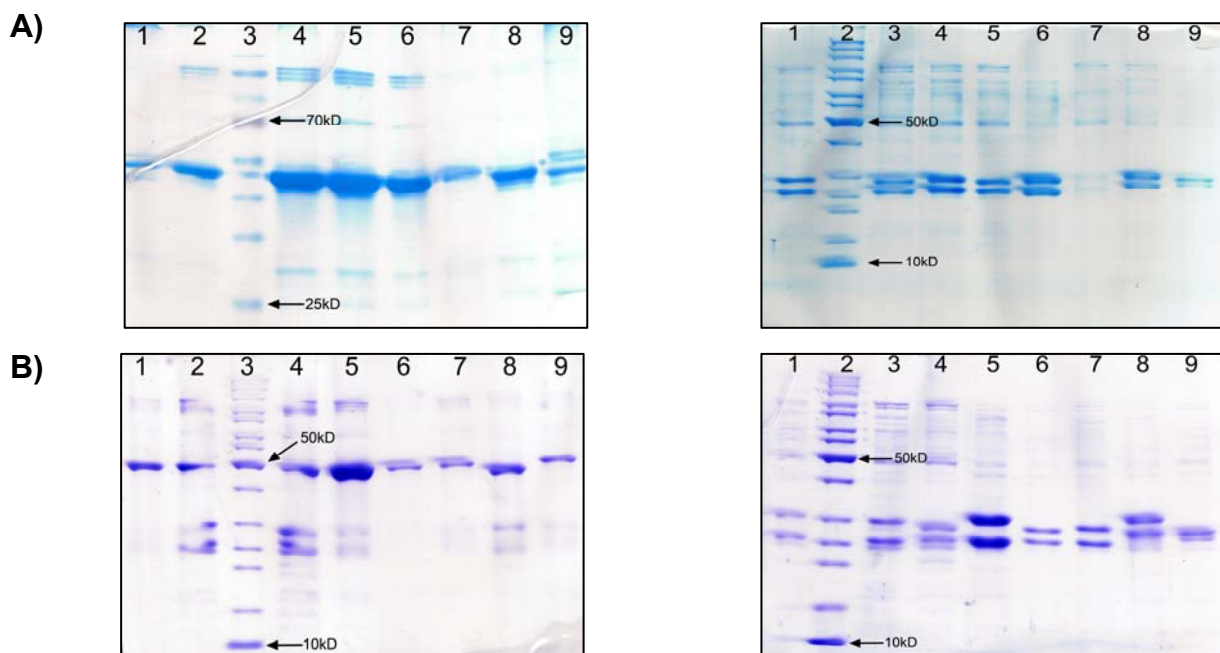


Abb. 10: Visualisierung der Fab-Antikörper im Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie; A) Linke Abbildung: nicht reduzierendes Gel der Klone IIB1 (1); IIC2 (2); Längenmarker: PageRuler™ Prestained (3); IIG2 (4); IIH1 (5), IIIB1 (6); IIID2 (7); VIC1 (8); VIE1 (9); Rechte Abbildung: reduzierendes Gel der Klone IIB1 (1); Längenmarker: PageRuler™ (2); IIC2 (3); IIG2 (4); IIH1 (5), IIIB1 (6); IIID2 (7); VIC1 (8); VIE1 (9); **B)** Linke Abbildung: nicht reduzierendes Gel der Klone VIIIB1 (1); VIID1 (2); Längenmarker: PageRuler™ (3); VIIIA2 (4); VIIIE1 (5), IXG2 (6); XA1 (7); XE1 (8); XIA2 (9); Rechte Abbildung: reduzierendes Gel der Klone VIIIB1 (1); Längenmarker: PageRuler™ (2); VIID1 (3); VIIIA2 (4); VIIIE1 (5), IXG2 (6); XA1 (7); XE1 (8); XIA2 (9)

2.2. Überprüfung der MHC-Peptid-Spezifität mittels ELISA

In einem nächsten Schritt erfolgte die Bestimmung der spezifischen Reaktivität der 16 selektionierten Klone gegen rekombinante MHC-Peptid-Komplexe. Zu diesem Zweck wurden Phagen und Fab-Antikörper der jeweiligen Klone gegen ein erweitertes Panel an MHC-Peptid-Komplexen getestet.

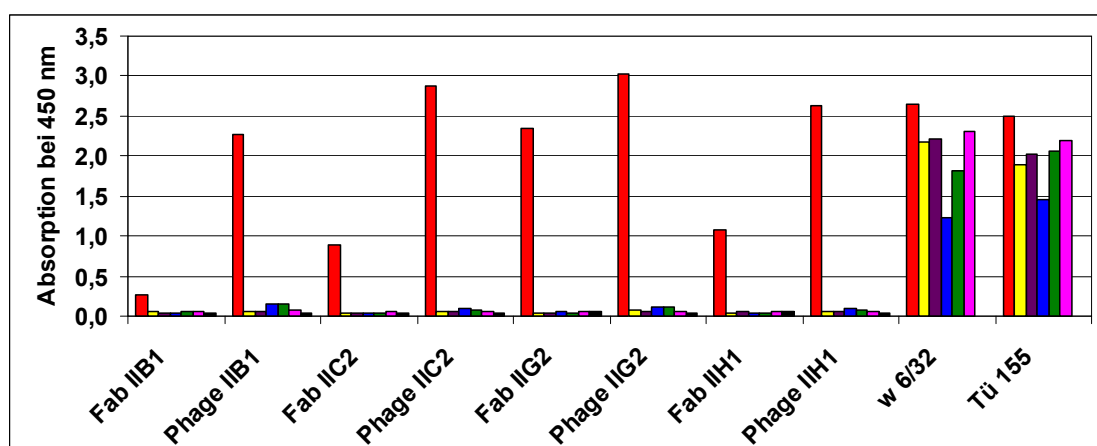
Hierbei wurde der MHC-Peptid-Komplex auf einer Microtiter-Platte immobilisiert. Die zu testenden Fabs wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml und die Phagen 1:300 verdünnt eingesetzt.

Folgende MHC-Peptid-Komplexe wurden verwendet:

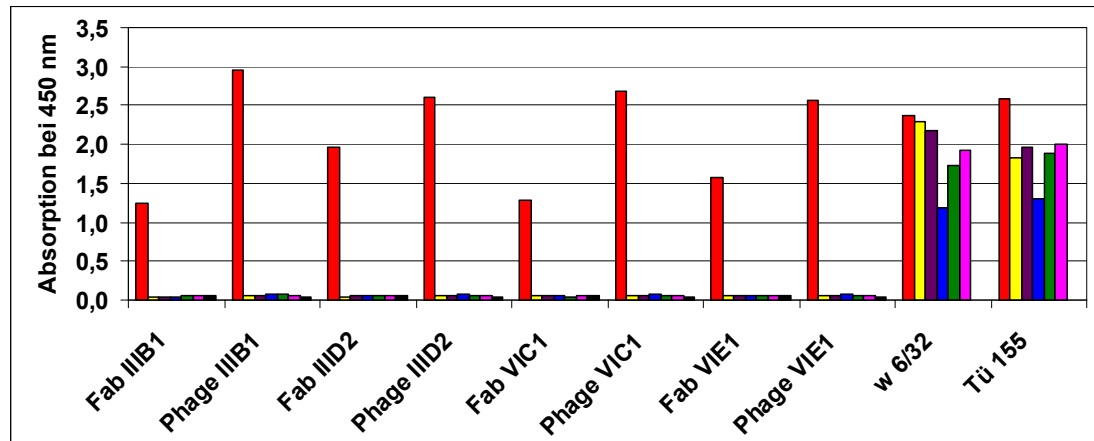
- SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201
 - SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201
 - CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ / HLA-A*0201
 - Melan A (AA)₂₇₋₃₅ / HLA-A*0201
 - Melan A A27L (ELA)₂₆₋₃₅ / HLA-A*0201
 - NY-ESO 1₅₇₋₁₆₅ / HLA-A*0201
- } irrelevante Kontroll-MHC-Peptid-Komplexe

Als positives Signal wurde gewertet, wenn die Absorption bei 450 nm den dreifachen Hintergrundwert überschritt. Als Hintergrundsignal wurde die Reaktion der sekundären Färbeantikörper gegen biotinyliertes bovines Serumalbumin und Streptavidin definiert. Mit den konformationabhängigen Antikörpern W6/32 und Tü 155 wurde überprüft, ob die MHC-Peptid-Komplexe noch in ihrer korrekten Quartärstruktur vorliegen. Wäre z.B. kein Peptid mehr in der Tasche des MHC-Komplexes, gäbe es mit dem Kontroll-Antikörper Tü 155 kein Signal. So ist z.B. bei dem Melan-A 27-35 / HLA-A*0201 Komplex ein deutlich schwächeres Signal zu erkennen, was bedeuten kann, dass hier nicht mehr alle Komplexe ein Peptid enthalten.

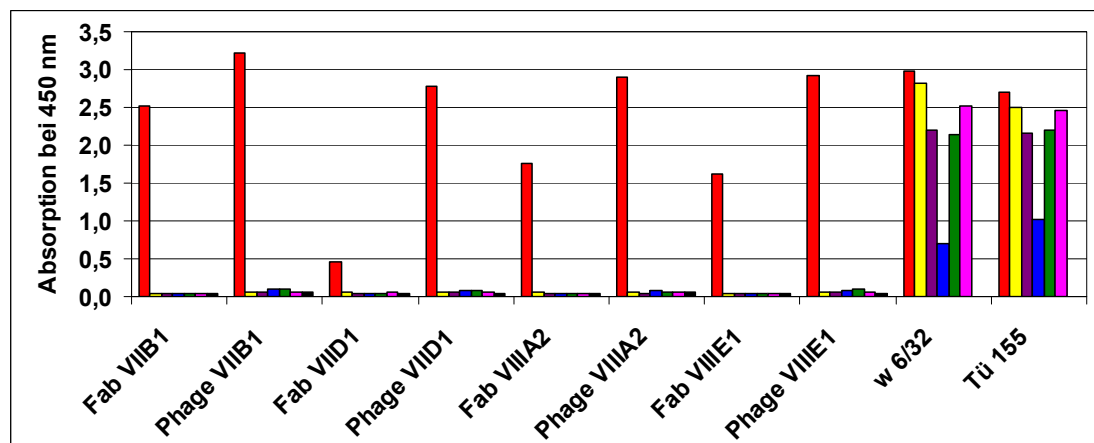
A)



B)



C)



D)

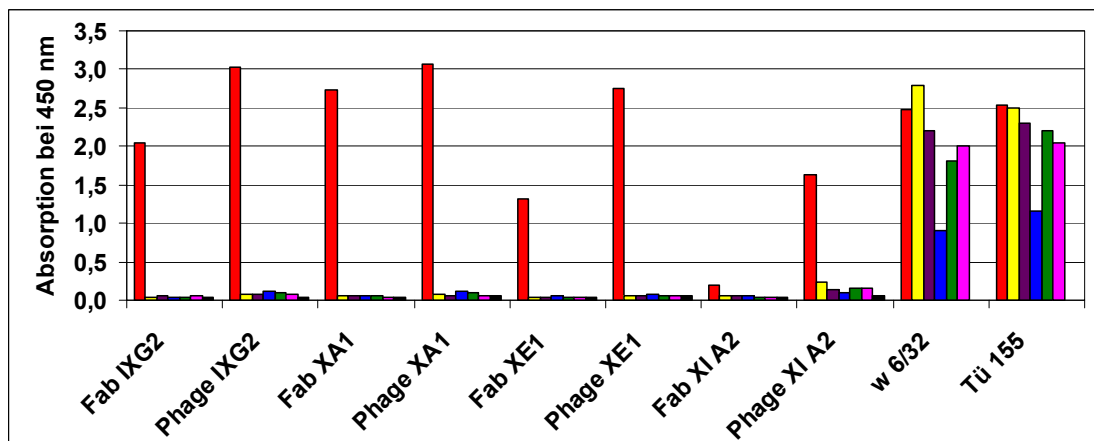


Abb. 11: Spezifische Bindung der 16 Klone im ELISA auf immobilisierten HLA-A*0201-Komplexen, welche ein Panel verschiedener Peptide präsentieren; Spezifische Bindung der Klone **A)** IIB1, IIC2; IIG2 und IIH1; **B)** IIIB1, IIID2, VIC1 und VIE1; **C)** VIIB1, VIID1, VIIIA2 und VIIIE1; **D)** IXG2, XA1, XE1 und XIA2 sowie der Positivkontrollen w6/32 und Tü 155 auf SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 (rot), SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 (gelb), CMV pp65 495-503 / HLA-A*0201 (violett), Melan A (AA) 27-35 / HLA-A*0201 (blau), Melan A A27L (ELA) 26-35 / HLA-A*0201 (grün), NY-ESO 157-165 / HLA-A*0201 (rosa); Negativkontrolle (schwarz): Phage bzw. Fab-Antikörper auf biotinyliertem BSA mit Streptavidin und sekundären Antikörpern

Aus Abbildung 11 geht hervor, dass alle hier getesteten SSX2-Klone spezifisch nur an SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 binden.

2.3. Überprüfung der spezifischen Reaktivität gegen exogen mit Peptid beladene Zellen

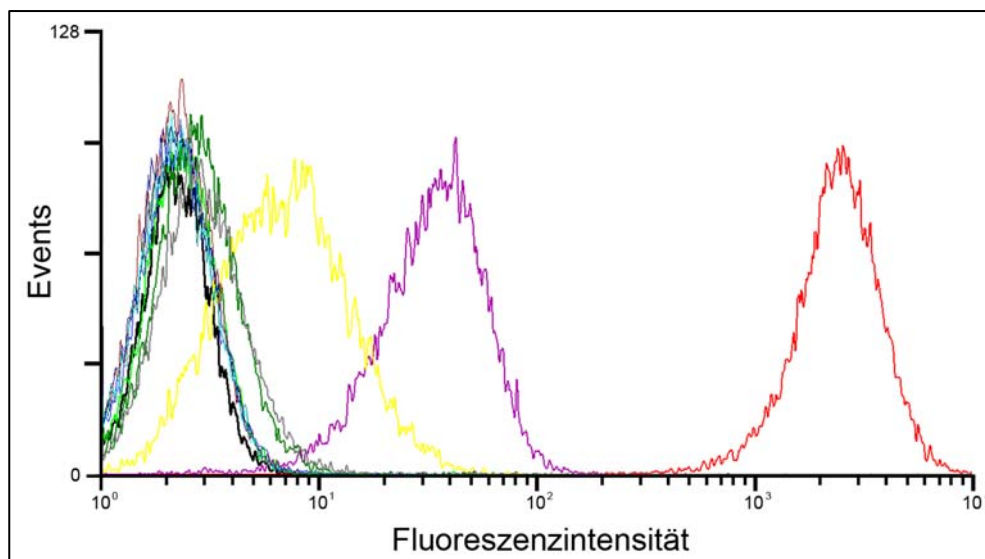
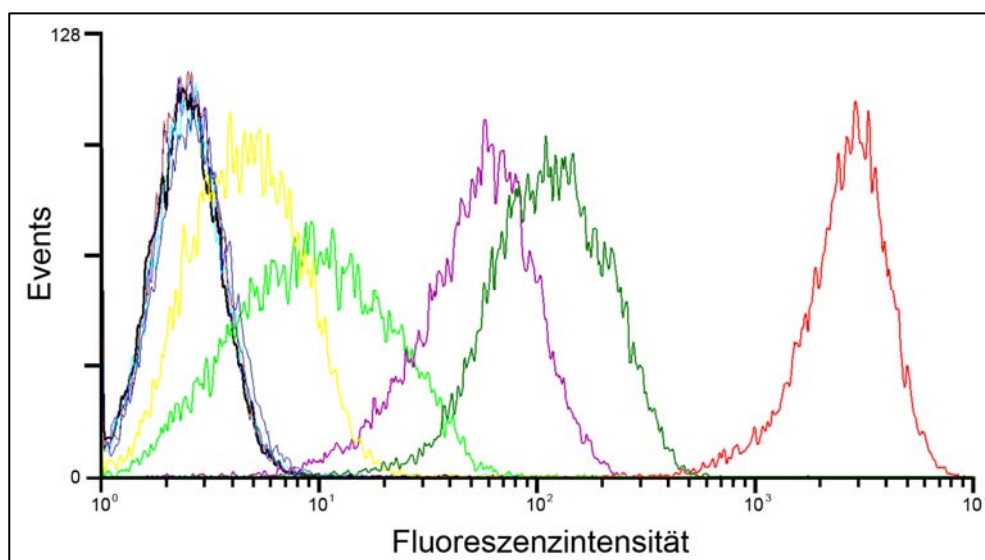
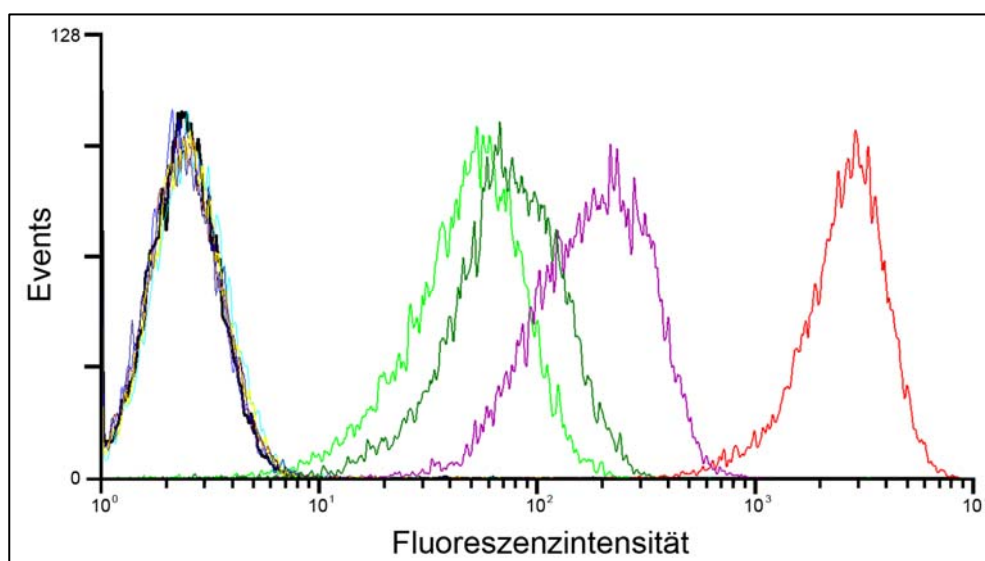
2.3.1. Ergebnisse der gegen den SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-Komplex selektionierten Fab-Antikörper

2.3.1.1. Reaktivität gegenüber T2-Zellen

Um die Reaktivität der Fab-Antikörper gegenüber der eigentlichen Zielstruktur, dem nativen, auf der Zelle präsentierten MHC-Peptid-Komplex, testen zu können, wurden in einem ersten Versuch HLA-A*0201-positive T2-Zellen mit verschiedenen Peptiden gepulst.

T2-Zellen entstammen einer humanen HLA-A*0201-positiven lymphoblastoiden B-T-Hybrid-Zelllinie, welche TAP (transporter associated with antigen processing)-defizient ist. Es existieren beim Menschen zwei Varianten des TAP-Proteins, TAP-1 und TAP-2, welche zur Proteinfamilie der ATP-Bindungskassetten (ATP-bindingcasette, ABC) gehören. In vivo erfolgt die Induktion der Gene durch Interferone. TAP ist ein ATP-abhängiger Transporter in der Membran des ER und verantwortlich für den Transport von Ionen, Zuckern, Aminosäuren und Peptiden in dessen Inneres. Dort erfolgt dann in Vesikeln die „Beladung“ der noch leeren MHC-Komplexe, welche somit nicht mit dem Zytosol in Kontakt stehen. Durch die TAP-Defizienz ist somit die intrazelluläre Beladung von MHC I-Komplexen mit Peptiden reduziert, was schließlich dazu führt, dass sich auf der Zelloberfläche „leere“ MHC I-Komplexe befinden. Jedoch können die vorhandenen MHC-Komplexe von exogen mit Peptiden beladen werden, welche das passende Bindungsmotiv besitzen. Die Peptide gehen dann mit dem MHC-Komplex eine stabile Bindung ein und werden somit auf der Zelloberfläche „präsentiert“.

Als Erstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die Fab-Antikörper aller 16 Klone in der Lage sind, mit nativen MHC-Peptid-Komplexen zu interagieren. Hierzu wurden T2-Zellen zunächst nur mit dem Zielpeptid SSX2₁₀₃₋₁₁₁ in der Endkonzentration 20 µg/ml beladen und mit dem jeweiligen Fab-Antikörper in der Endkonzentration 50 µg/ml gefärbt.

A)**B)****C)**

D)

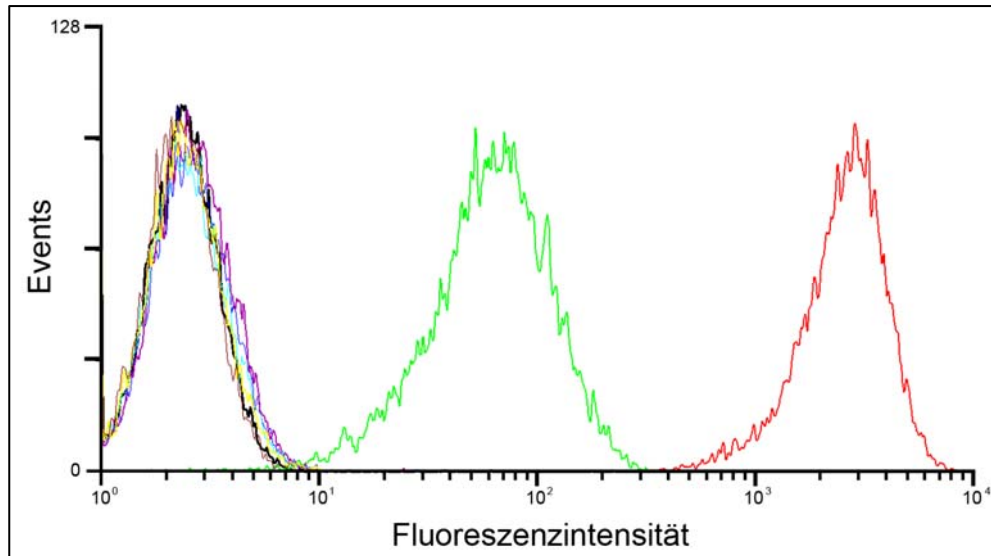


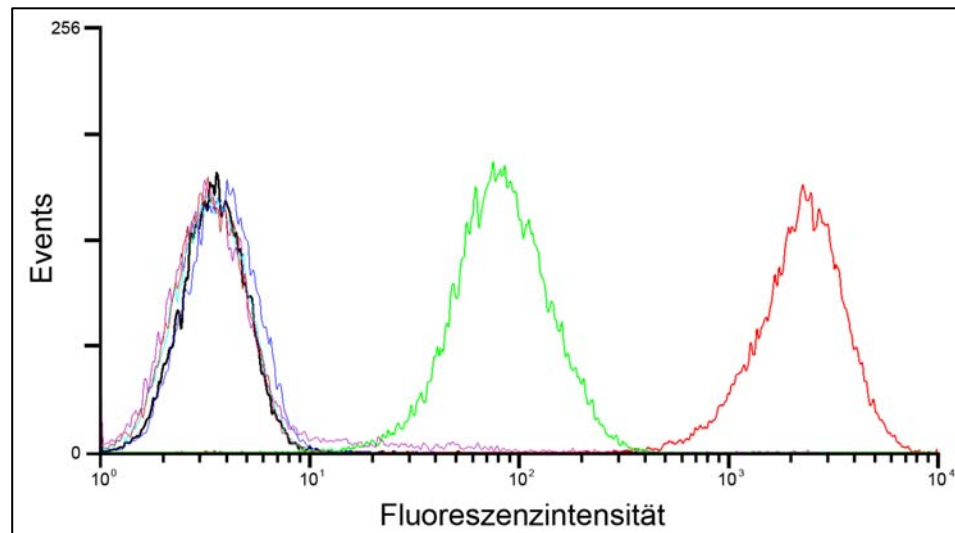
Abb. 12: Durchflusszytometrie der 16 Fab-Antikörper auf mit **SSX2₁₀₃₋₁₁₁** beladenen T2-Zellen; **Beladene T2-Zellen** wurden gefärbt mit **A)** IIB1 (hellgrün), VIIB1 (violett), VIIIA2 (gelb), XE1 (dunkelgrün) und XIA2 (grau); **B)** IIC2 (hellgrün), IIG2 (violett), IIH1 (gelb) und IIID2 (dunkelgrün); **C)** VIC1 (hellgrün), VIE1 (violett), VIID1 (gelb) und IXG2 (dunkelgrün); **D)** XA1 (hellgrün), IIIB1 (violett), VIIIE1 (gelb); **Unbeladene T2-Zellen** wurden gefärbt mit **A)** IIB1 (blau), VIIB1 (hellblau), VIIIA2 (braun), XE1 (dunkelblau) und XIA2 (türkis); **B)** IIC2 (blau), IIG2 (hellblau), IIH1 (braun) und IIID2 (dunkelblau); **C)** VIC1 (blau), VIE1 (hellblau), VIID1 (braun) und IXG2 (dunkelblau); **D)** XA1 (blau), IIIB1 (hellblau), VIIIE1 (braun); Positivkontrolle BB7.2 (rot); Negativkontrolle: Sekundäre Färbereagenzien (schwarz)

Es stellte sich dabei heraus, dass nicht alle Fab-Antikörper, die im ELISA den in vitro hergestellten MHC-Peptid-Komplex erkannten, auch eine Reaktivität gegenüber dem nativen auf der Zelloberfläche präsentierten MHC-Peptid-Komplex zeigten. Kein Signal auf exogen beladenen Zellen zeigten die Klone IIB1, IIIB1, VIID1 und VIIIE1. Diese 4 Klone wurden aufgrund ihres Bindungsverhaltens im Rahmen der Doktorarbeit als „in vitro-Binder“ bezeichnet, da sie, im Gegensatz zu den sog. „Nativ-Bindern“, nur im ELISA binden, nicht jedoch auf exogen beladenen Zellen. Auf das Phänomen der „in vitro-Binder“ wird in Kapitel 3 näher eingegangen. Ein relativ schwaches Signal fand sich bei den Klonen IIH1, XE1 und XIA2. Von den verbleibenden Klonen lieferten die Fab-Antikörper VIE1 und IIID2 das intensivste Signal.

Nachdem die Fähigkeit, auf nativen MHC-Peptid-Komplexen zu binden, an T2-Zellen gezeigt wurde, erfolgten in einem nächsten Schritt Analysen bezüglich der Spezifität der Klone auf T2-Zellen. Hierfür wurden diese mit einem Panel an HLA-A*0201-restringierten Peptiden von extern beladen und mit den entsprechenden Fab-Antikörpern gefärbt. Die Daten wurden von den 7 auf T2-Zellen gut bindenden Fab-

Antikörpern erhoben. Der Übersichtlichkeit halber sind exemplarisch die Daten der beiden besten Binder dargestellt. Die Peptide wurden jeweils in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt, der Fab-Antikörper mit 50 µg/ml.

A)



B)

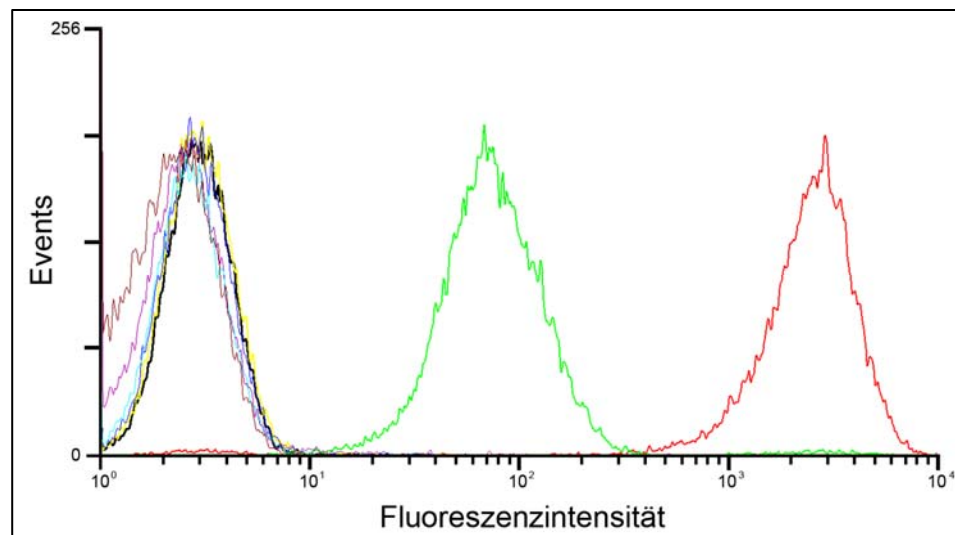


Abb. 13: Durchflusszytometrie am Beispiel der zwei besten Binder auf T2-Zellen, beladen mit einem Panel an Peptiden; T2-Zellen beladen mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (hellgrün), SSX2₄₁₋₄₉ (gelb), g250₄₂₁₋₄₂₉ (blau), NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ (violett), gp100₂₀₉₋₂₁₇ (hellblau), Melan A A27L (ELA)₂₆₋₃₅ (braun); Färbung mit **A)** Klon IIID2; **B)** Klon VIE1; Negativkontrolle: sekundäre Färbereagenzien (schwarz); Positivkontrolle BB7.2 (rot)

Es stellte sich heraus, dass die getesteten Fab-Antikörper IIG2, IIID2, VIC1, VIE1, VIIB1, IXG2 und XA1 spezifisch mit T2-Zellen interagierten, die das relevante SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Peptide im Kontext des HLA-A*0201 Komplex präsentierten.

2.3.1.2. *Reaktivität auf EBV-immortalisierten B-Zellen (LCLs)*

In einem nächsten Schritt erfolgten durchflusszytometrische Analysen der 7 besten Binder auf EBV-immortalisierten B-Zellen humaner Spender.

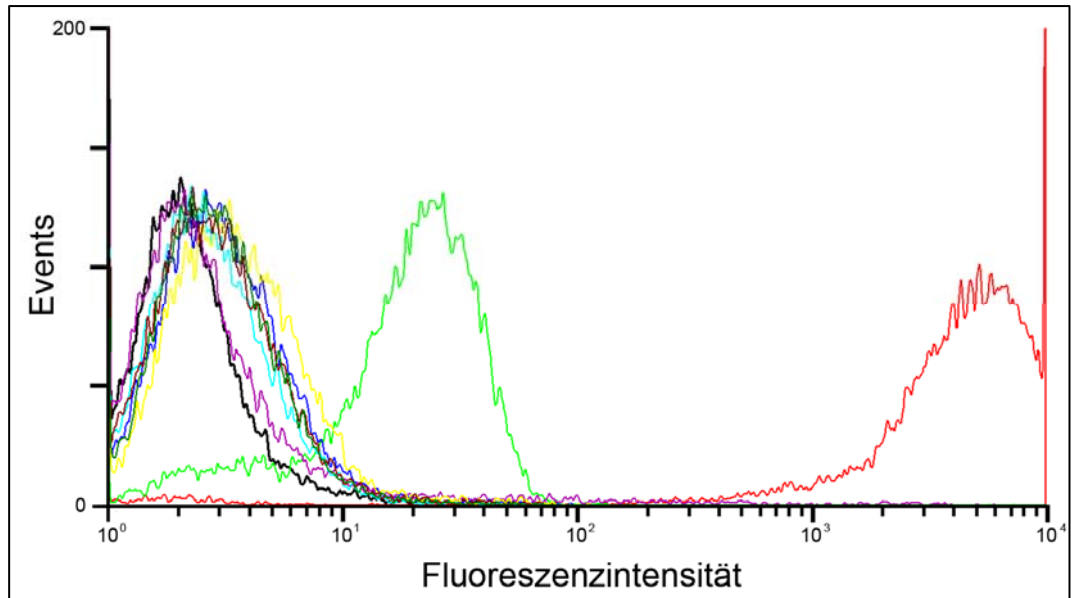
Diese lymphoblastoide Zelllinie entsteht durch Infektion und Immortalisierung primärer humaner B-Zellen durch das Epstein-Barr-Virus in vitro. Diese EBV-Transformation stellt die einfachste Möglichkeit dar, eine permanente Zelllinie aus einem gesunden Spender herzustellen, wobei das EBV in den Zellen vorwiegend im Latenzzustand III mit Expression sämtlicher latenter Proteine vorliegt.

In diesem Fall wurden zwei Zelllinien EBV-immortalisierter B-Zellen verwendet, welche jeweils aus humanen B-Zellen gesunder Spender generiert wurden: Als „Positivlinie“ eine Linie, welche HLA-A*0201 exprimiert, sowie als „Negativlinie“ eine Linie ohne den HLA-A*0201-Komplex. Beide Zelllinien wurden von extern mit Peptiden beladen und anschließend mit den 7 o.g. Fab-Antikörpern gefärbt.

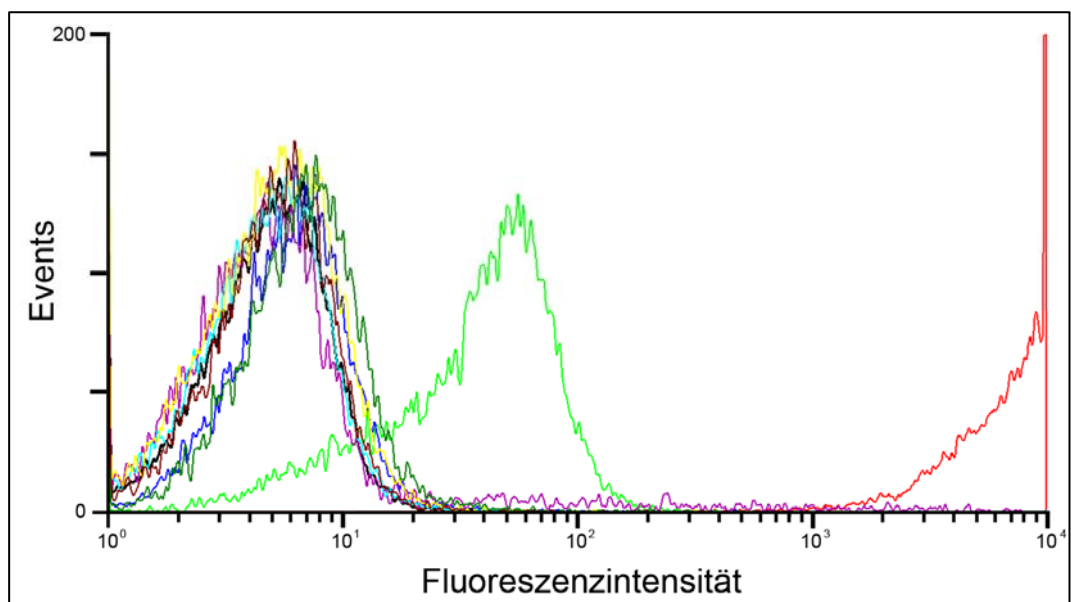
a) HLA-A*0201-positive EBV-immortalisierte B-Zellen

Um die bisherigen Ergebnisse auf T2-Zellen zu bestätigen und auszuschließen, dass es sich bei den in Kapitel 2.3.1 dargestellten Beobachtungen um ein ausschließlich auf T2-Zellen zu beobachtendes Phänomen handelt, führten wir weitere durchflusszytometrische Analysen mit antigenpräsentierenden Zellen durch. Dadurch sollte einerseits verifiziert werden, dass die Interaktion der Fab-Antikörper mit dem MHC-Komplex peptidspezifisch und auf das HLA-A*0201 Allel beschränkt ist. Andererseits bieten Untersuchungen auf LCLs den Vorteil, dass diese im Gegensatz zu T2-Zellen nicht TAP-defizient sind. Folglich exprimieren sie schon im „nativen“, d.h. unbeladenen Zustand, ein Panel von Peptiden auf ihrer Zelloberfläche. Die Untersuchungen auf diesen Zellen kommen somit dem Zustand einer „normalen“ Zelle schon sehr nahe. Die LCLs wurden mit einem identischen Panel an Peptiden in einer Konzentration von 20 µg/ml beladen und anschließend mit den Fab-Antikörpern (Endkonzentration 50 µg/ml) gefärbt. Da die LCLs keine „leeren“ MHC I-Komplexe besitzen, erfolgt die Beladung im Gegensatz zu T2-Zellen durch kompetitive Verdrängung bereits präsentierter Peptide aus der Bindungsfurche. Exemplarisch sind die Daten der drei besten Binder auf LCLs dargestellt:

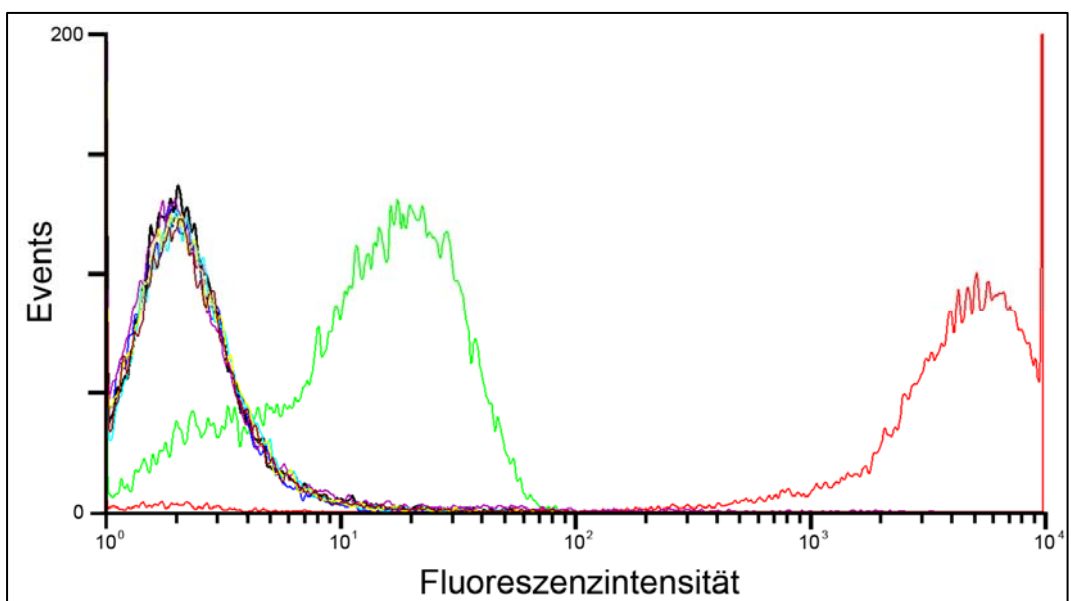
A)



B)



C)



D)

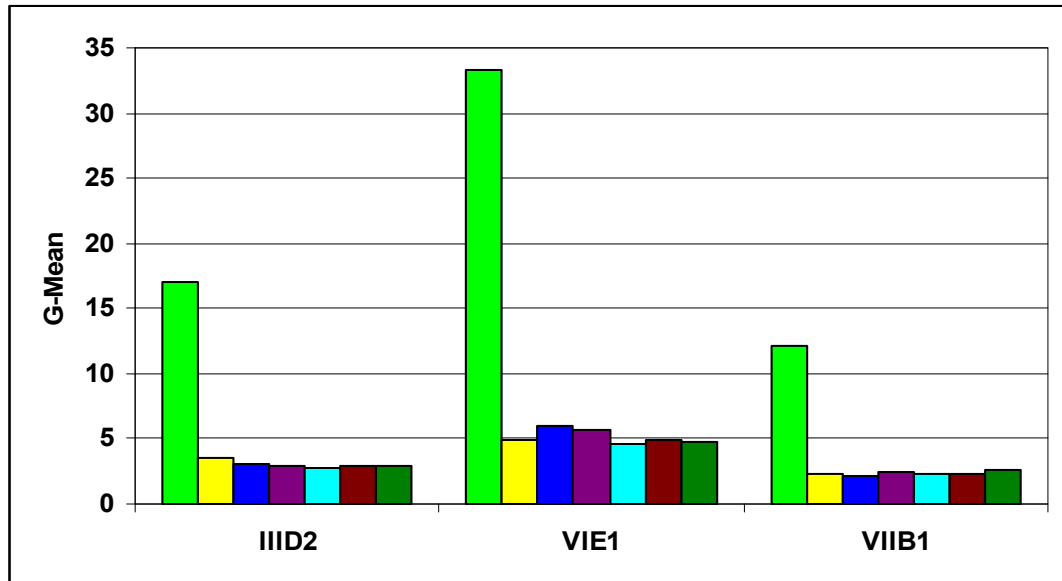


Abb. 14: Durchflusszytometrie der drei besten Binder auf HLA-A*0201-positiven LCLs, beladen mit einem Panel an Peptiden; LCLs beladen mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (hellgrün), SSX2₄₁₋₄₉ (gelb), g250₄₂₁₋₄₂₉ (blau), NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ (violett), gp100₂₀₉₋₂₁₇ (hellblau), Melan A A27L (ELA)₂₆₋₃₅ (braun), unbeladen (dunkelgrün); Negativkontrolle: sekundäre Färbereagenzien (schwarz); Positivkontrolle w6/32 (rot); Färbung mit **A)** Klon IIID2; **B)** Klon VIE1; **C)** Klon VIIB1; **D)** Histogramme der 3 Klone mit Auftragung des G-Mean-Wertes

Die Spezifitätsanalysen auf EBV-immortalisierten B-Zellen in Abbildung 14 zeigen, dass auch in dieser Versuchsreihe die Ergebnisse sowohl den ELISA als auch die Spezifitätsanalysen auf T2-Zellen bestätigen: Bei allen drei Fab-Antikörpern kann man einen Unterschied zwischen den FI-Werten des SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Peptids und der Kontroll-Peptide feststellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Spezifität der Fab-Antikörper kein rein auf T2-Zellen beobachtetes Phänomen darstellt. Weiterhin fällt auf, dass die FI-Werte bei gleicher Peptidkonzentration nach Färbung mit dem Fab-Antikörper VIE1 am höchsten und die Hintergrundwerte des Klons IIID2 am niedrigsten sind.

b) HLA-A*0201-negative EBV-immortalisierte B-Zellen

Die durchflusszytometrischen Analysen an HLA-A*0201-negativen EBV-immortalisierten B-Zellen sollten zeigen, dass die Fab-Antikörper Allel-spezifisch sind für den HLA-A*0201-Peptid-Komplex. Dazu wurden die Zellen von extern mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ beladen und mit den Fab-Antikörpern gefärbt. Als Positivkontrolle diente der Anti-Human HLA-ABC Klasse I W6/32.

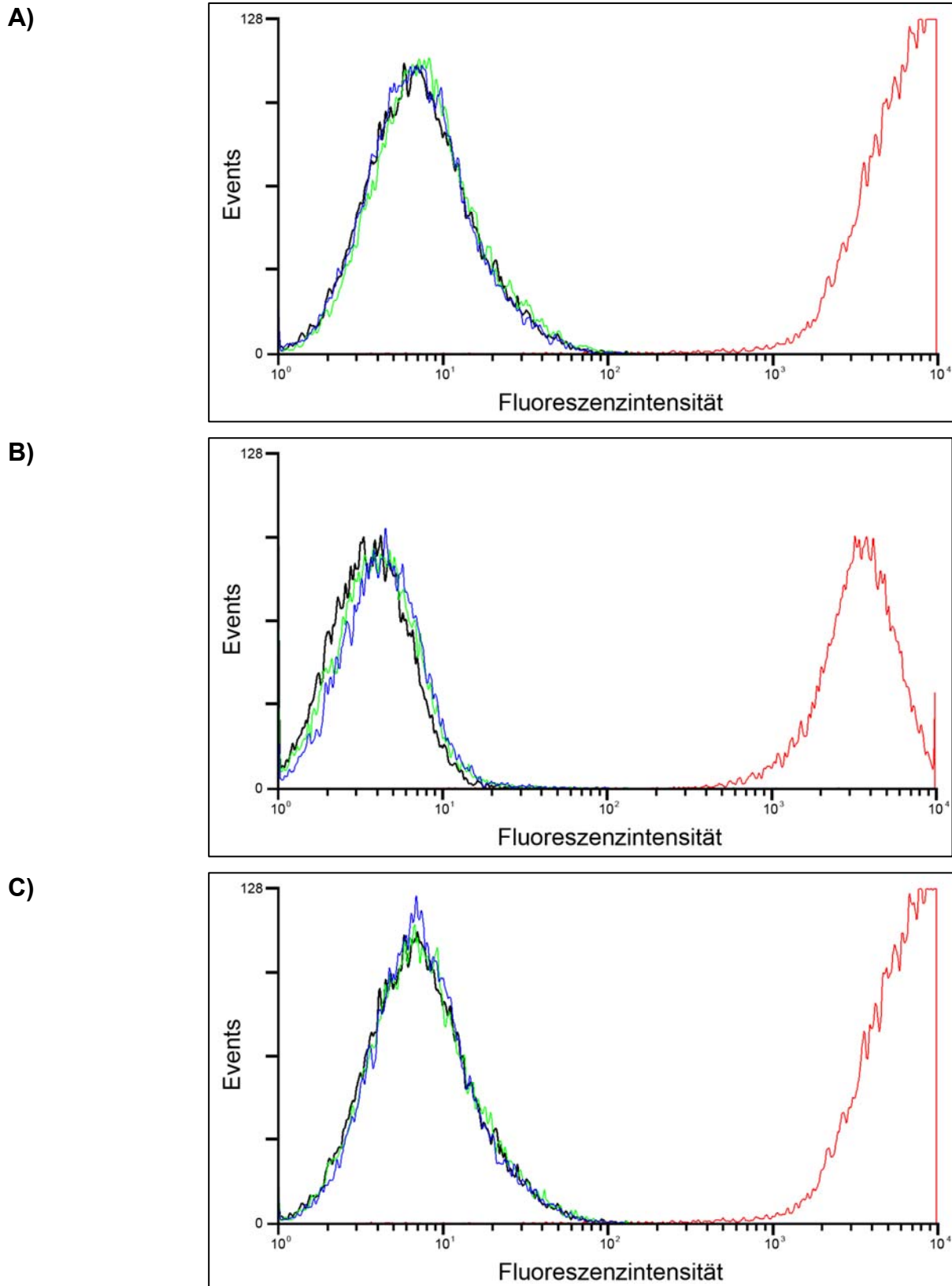


Abb. 15: Durchflusszytometrie der drei besten Binder auf HLA-A*0201-negativen LCLs beladen mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁; LCLs beladen mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (hellgrün); unbeladen (blau); Negativkontrolle: sekundäre Färbereagenzien (schwarz); Positivkontrolle w6/32 (rot); Färbung mit **A)** Klon IIID2; **B)** Klon VIE1; **C)** Klon VIIB1

Die Abbildung 15 bestätigt, bezogen auf die hier getestete Zelllinie EBV-immortalisierter B-Zellen, die Spezifität der Klone für HLA-A*0201-restringierte MHC-Peptid-Komplexe, was die fehlende FI-Änderung in der Durchflusszytometrie verdeutlicht.

2.3.2. Ergebnisse der gegen den SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex selektionierten Fab-Antikörper

Aus den von Herrn Dr. Carsten Zwick durchgeführten Selektionen gegen den SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex gingen insgesamt 3 Klone (Fab 1-3) hervor, welche zur Verifizierung ihrer Diversität sequenziert wurden. Zudem wurde zur Bestimmung der spezifischen Reaktivität der 3 selektionierten Klone gegen rekombinante MHC-Peptid-Komplexe ein ELISA mit Phagen und Fab-Antikörpern durchgeführt. Der ELISA ergab, dass alle getesteten SSX2-Klone spezifisch mit dem SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex interagierten. Nach diesem Assay überließ mir Herr Dr. Carsten Zwick die 3 Klone und die weiteren Analysen wurden eigenhändig durchgeführt.

2.3.2.1. Reaktivität gegenüber T2-Zellen

Wie in Kapitel 2.3.1.1 wurden T2-Zellen zunächst nur mit dem Peptid SSX2₄₁₋₄₉ in der Endkonzentration 20 µg/ml beladen und mit dem jeweiligen Fab-Antikörper in der Endkonzentration 50 µg/ml gefärbt. Es stellte sich dabei heraus, dass nicht alle Fab-Antikörper, die im ELISA den in vitro hergestellten MHC-Peptid-Komplex erkannten, auch eine Reaktivität gegenüber dem nativen auf der Zelloberfläche präsentierten MHC-Peptid-Komplex zeigten. Lediglich Fab2 und Fab3 zeigten eine Änderung der Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie und wurden in einem nächsten Schritt Analysen bezüglich ihrer Spezifität auf T2-Zellen zugeführt. Hierfür wurden diese mit einem Panel an HLA-A*0201-restringierten Peptiden von extern beladen und mit den entsprechenden Fab-Antikörpern gefärbt.

Die Peptide wurden jeweils in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt, der Fab-Antikörper mit 50 µg/ml.

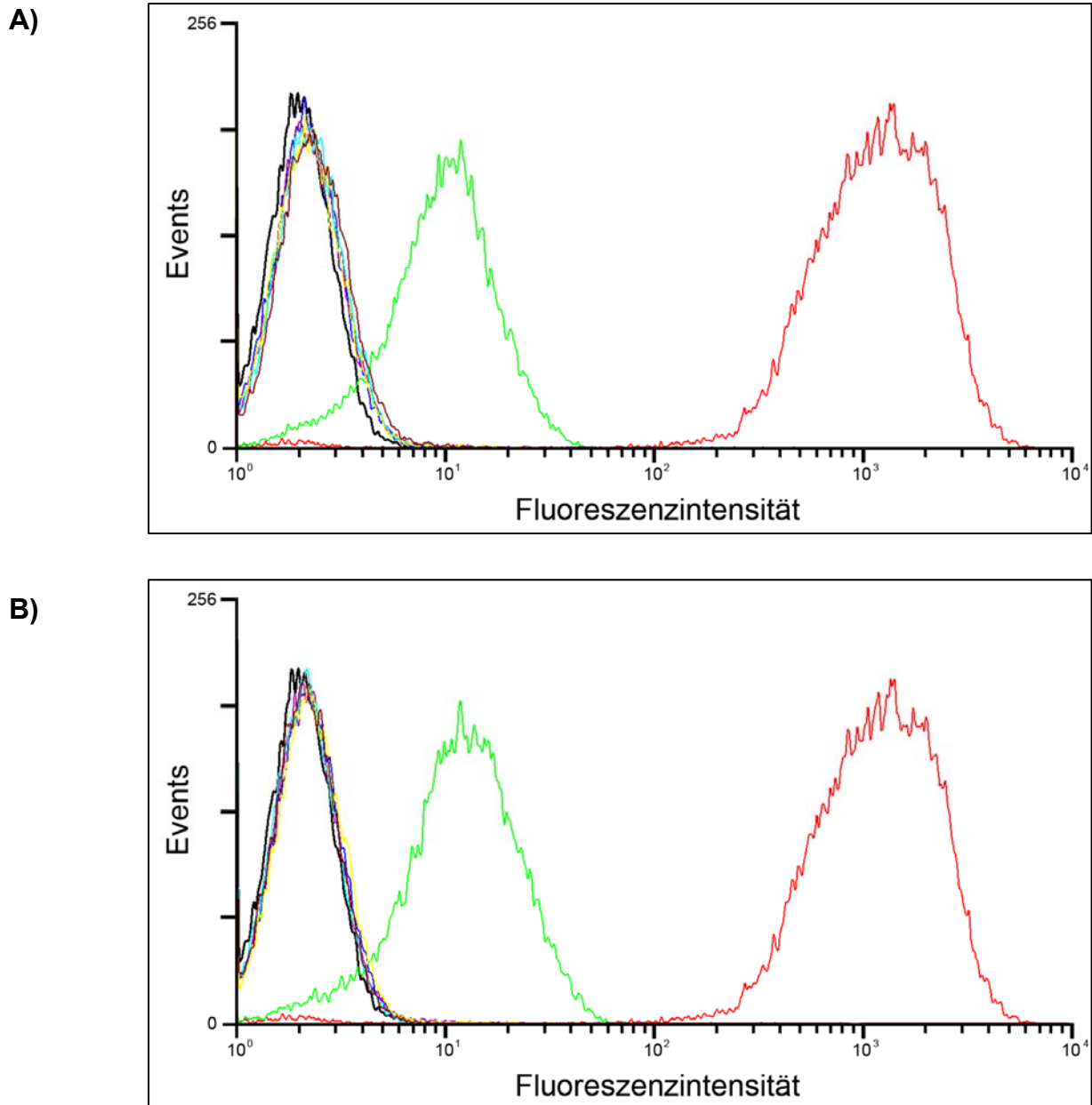


Abb. 16: Durchflusszytometrie der beiden Binder auf T2-Zellen, beladen mit einem Panel an Peptiden; T2-Zellen beladen mit SSX2₄₁₋₄₉ (hellgrün), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (gelb), g250₄₂₁₋₄₂₉ (blau), NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ (violett), gp100₂₀₉₋₂₁₇ (hellblau), Melan A A27L (ELA)₂₆₋₃₅ (braun); Färbung mit **A)** Fab2; **B)** Fab3; Negativkontrolle: sekundäre Färbereagenzien (schwarz); Positivkontrolle BB7.2 (rot)

Aus Abbildung 16 kann man entnehmen, dass sowohl Fab2 als auch Fab3 in der Lage sind, spezifisch mit T2-Zellen zu interagieren, die das relevante SSX2₄₁₋₄₉-Peptid im Kontext des HLA-A*0201 Komplex präsentieren. Im weiteren Verlauf der Arbeit fand Fab2 aufgrund des etwas geringeren Signals auf T2-Zellen keine weitere Berücksichtigung.

2.3.2.2. *Reaktivität auf EBV-immortalisierten B-Zellen (LCLs)*

In einem nächsten Schritt erfolgten durchflusszytometrische Analysen von Fab3 auf EBV-immortalisierten B-Zellen humaner Spender. Zu den Gründen, warum es sinnvoll ist, die Untersuchungen zusätzlich auf einer zweiten Zelllinie durchzuführen, siehe Kapitel 2.3.1.2.

a) **HLA-A*0201-positive EBV-immortalisierte B-Zellen**

Die LCLs wurden mit einem identischen Panel an Peptiden in einer Konzentration von 20 µg/ml beladen und anschließend mit Fab3 (Endkonzentration 50 µg/ml) gefärbt:

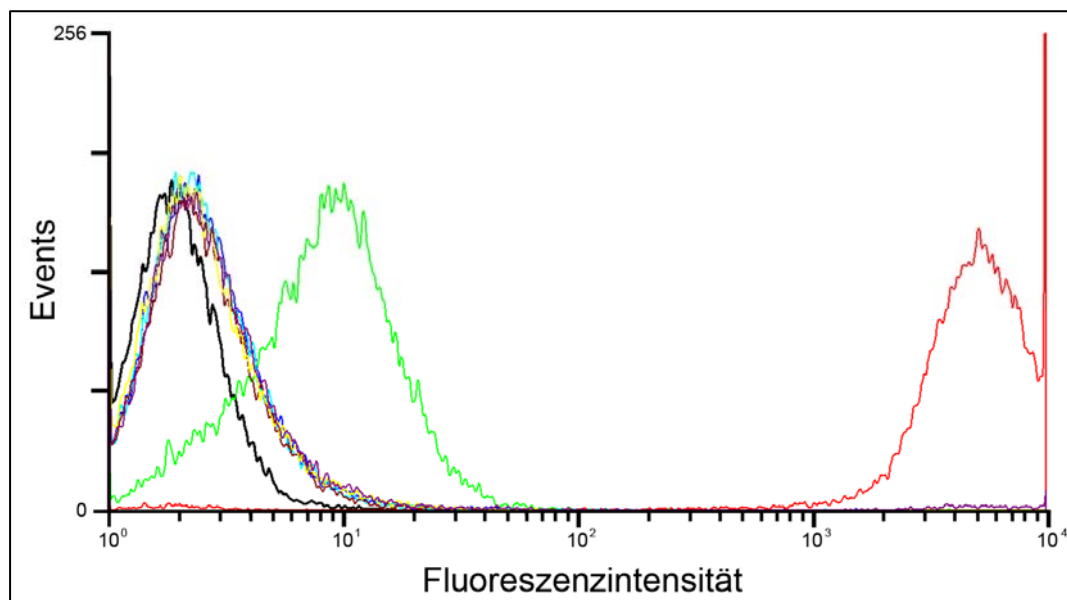


Abb. 17: Durchflusszytometrie des Klons Fab3 auf HLA-A*0201-positiven LCLs, beladen mit einem Panel an Peptiden; LCLs beladen mit SSX2₄₁₋₄₉ (hellgrün), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (gelb), g250₄₂₁₋₄₂₉ (blau), NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ (violett), gp100₂₀₉₋₂₁₇ (hellblau), Melan A A27L (ELA)₂₆₋₃₅ (braun); Negativkontrolle: sekundäre Färbereagenzien (schwarz); Positivkontrolle BB7.2 (rot); Färbung mit Fab3

Die Spezifitätsanalysen auf EBV-immortalisierten B-Zellen in Abbildung 17 bestätigen die Ergebnisse aus dem ELISA und die Spezifitätsanalysen auf T2-Zellen: Es ist ein Unterschied zwischen den FI-Werten des SSX2₄₁₋₄₉-Peptids und der Kontroll-Peptide festzustellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Spezifität von Fab3 kein rein auf T2-Zellen beobachtetes Phänomen darstellt.

b) HLA-A*0201-negative EBV-immortalisierte B-Zellen

LCL-Zellen wurden von extern mit SSX2₄₁₋₄₉ (Endkonzentration: 20 µg/ml) beladen und mit Fab3 (Endkonzentration: 50 µg/ml) gefärbt. Als Positivkontrolle diente der anti-Human HLA-ABC Klasse I-Antikörper W6/32.

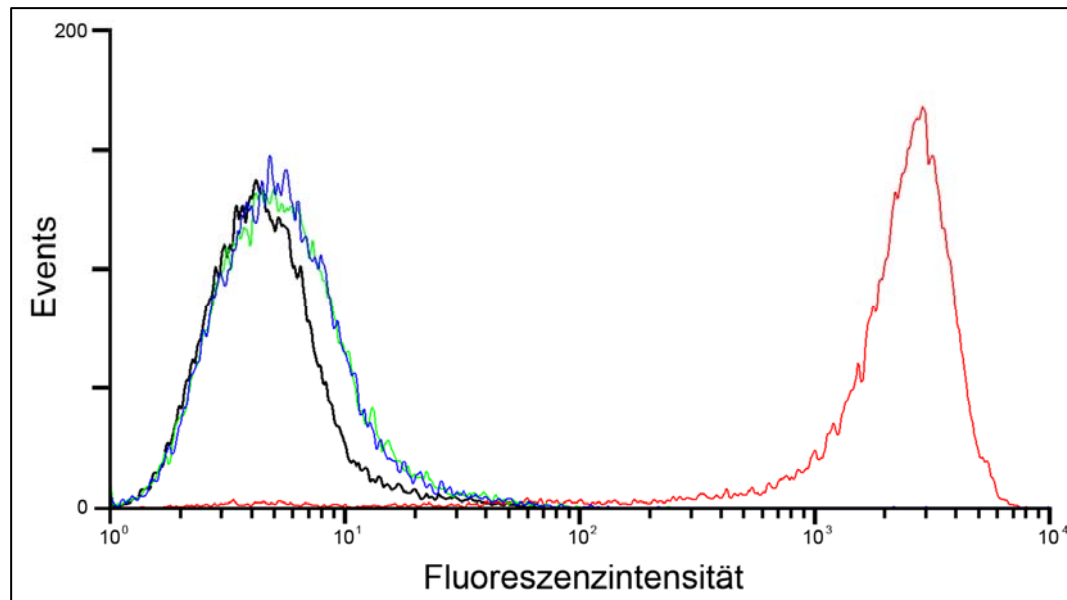


Abb. 18: Durchflusszytometrie des Klon Fab3 auf HLA-A*0201-negativen LCLs beladen mit dem Peptid SSX2₄₁₋₄₉; LCLs beladen mit SSX2₄₁₋₄₉ (hellgrün); unbeladen (blau); Negativkontrolle: sekundäre Färbereagenzien (schwarz); Positivkontrolle w6/32 (rot); Färbung mit Fab3

2.4. CTL-Inhibition mittels IFN γ -ELISPOT

Die folgende Versuchsreihe hatte eine Überprüfung der selektionierten Fab-Antikörper hinsichtlich ihrer Fähigkeit, einen T-Zell-Rezeptor zu imitieren, zum Ziel. Bindet ein Fab-Antikörper einen MHC-Peptid-Komplex an gleicher Stelle wie der für diesen MHC-Peptid-Komplex spezifische T-Zell-Rezeptor, so sollte auf diese Weise die Reaktivität einer zytotoxischen T-Zelle inhibiert werden. Folglich kann es nicht zu einer T-Zell-Aktivierung kommen.

Als Methode fand im vorliegenden Fall ein IFN γ -ELISPOT Anwendung. Hierbei gilt es zu beachten, dass jeder Spot einer reagierenden T-Zelle entspricht. Kommt es nun zu einer Inhibition durch den Fab-Antikörper, sollte sich die Anzahl der IFN γ ausschüttenden zytotoxischen T-Zellen, verglichen mit der Reaktivität gegen einen „ungeblockten“ MHC-Peptid-Komplex, stark verringern.

2.4.1. Ergebnisse der gegen den SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-Komplex selektionierten T-Zellen

Die zytotoxischen T-Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Claudia Wagner, Onkologisches Labor der Inneren Medizin I, zur Verfügung gestellt. Sie entstammten dem SSX2₁₀₃₋₁₁₁-spezifischen T-Zell-Klon G484, dessen spezifische Reaktivität im Vorfeld der Analysen mehrfach nachgewiesen werden konnte (Wagner et al., 2003).

2.4.1.1. *CTL-Inhibition auf exogen beladenen MCF7-Zellen*

Als Ziel-Zellen dienten 5×10^4 MCF7-Zellen, welche von exogen mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ in unterschiedlichen Konzentrationen sowie mit einem Kontrollpeptid beladen wurden. Es wurden 2.500 CD8⁺ SSX2-spezifische CTLs als Effektoren eingesetzt. Die Blockade mit Hilfe des epitopspezifischen Fab-Antikörpers erfolgte in einer fixen Konzentration von 50 µg/ml. Zur Erhöhung der Validität wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte sowie die sich daraus ergebenden Standardabweichungen aufgetragen.

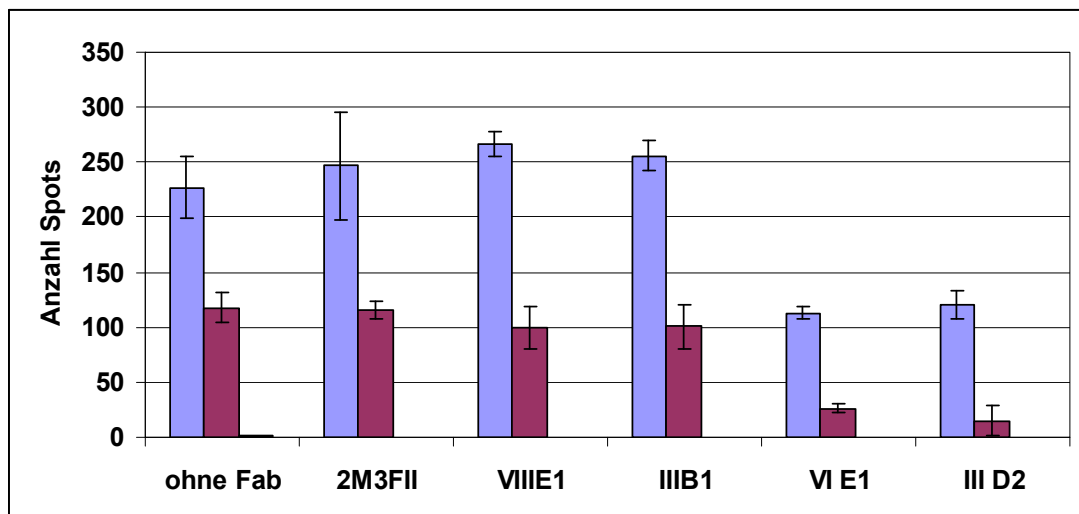


Abb. 19: Spezifische Inhibition der CTL-Reaktivität auf exogen beladenen MCF7-Zellen; HLA-A*0201⁺ MCF7-Zellen wurden mit dem Peptid SSX2₁₀₃₋₁₁₁ in den Konzentrationen 10 ng/ml (blau) und 5 ng/ml (violett) sowie mit dem Kontrollpeptid NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ (schwarz) beladen. Darstellung der CTL-Reaktivität ohne Fab-Antikörper bzw. nach Coinkubation mit 2M3FII (Kontrollantikörper), VIIIE1, IIIB1, VI E1 und IID2

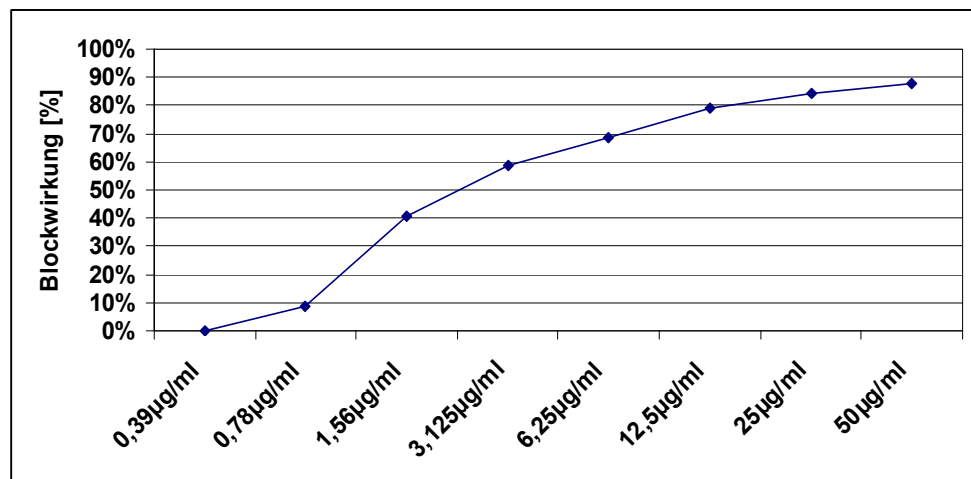
Es zeigt sich, dass mit den „Nativ-Bindern“ VI E1 bzw. IID2 eine Reduktion der im Experiment gemessenen Aktivierung von etwa 50% bei einer Peptidkonzentration von 10 ng/ml und 80% bzw. 90% bei einer Peptidkonzentration von 5 ng/ml erreicht

werden konnte. Im Gegensatz hierzu ließ sich keine Inhibition der IFN γ -Ausschüttung durch die „in vitro-Binder“ VIIIE1 und IIID2 nachweisen. Als Vergleichswert diente die Anzahl an Spots nach Vorinkubation der antigenpräsentierenden Zellen mit dem Fab-Antikörper 2M3FII, der SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 nicht erkennt.

2.4.1.2. CTL-Inhibition auf SK-Mel-37-Zellen

Als Target-Zellen wurden 5×10^4 SK-Mel-37-Zellen eingesetzt. Bei diesen Tumorzellen handelt es sich um eine HLA-A*0201⁺ Melanomzelllinie, die SSX2 endogen prozessiert und HLA-A*0201-restringierte Epitope auf der Zelloberfläche präsentiert, so dass eine Peptidbeladung entfiel. Es wurden 4.000 CD8⁺ SSX2-spezifische CTLs als Effektoren eingesetzt. Zum Nachweis der Blockade mittels des epitopspezifischen Fab-Antikörpers VIE1 erfolgte eine Fab-Titration in den Konzentrationen 50 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,39 $\mu\text{g/ml}$.

A)



B)

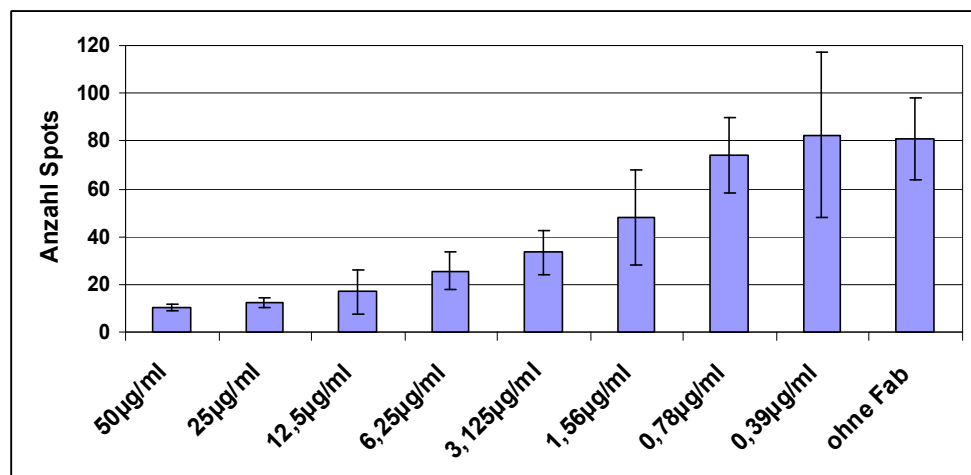


Abb. 20: Spezifische Inhibition der CTL-Reaktivität auf SK-Mel-37-Zellen; **A)** Darstellung der prozentualen Blockwirkung des Fab-Antikörpers VIE1 bei unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen; **B)** Darstellung der CTL-Reaktivität als Anzahl von Spots ohne Antikörper und nach Coinkubation mit VIE1 in unterschiedlichen Konzentrationen.

Aus den in Abbildung 20 dargestellten Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass der Fab-Antikörper VIE1 auf SK-Mel-37-Zellen dazu in der Lage ist, eine konzentrationsabhängige Inhibition der CTL-Reaktivität hervorzurufen. Somit war erstmalig der indirekte Nachweis erbracht, dass der Klon IVE1 nicht nur auf exogen mit dem Peptid SSX2₁₀₃₋₁₁₁ gepulsten Zellen bindet, sondern auch auf Tumorzellen, welche das Peptid endogen prozessieren und dann auf ihrer Zelloberfläche präsentieren.

2.4.2. Ergebnisse der gegen den SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex selektionierten T-Zellen

Die zytotoxischen T-Zellen wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Daniel Speiser, Ludwig Institute of Cancer Research, Lausanne (CH) zur Verfügung gestellt. Sie entstammen im Gegensatz zu dem SSX2₁₀₃₋₁₁₁-spezifischen T-Zell-Klon G484 der Bulk-T-Zell-Linie Lau459, deren spezifische Reaktivität im Vorfeld der Analysen mehrfach nachgewiesen worden war (Ayyoub et al., 2002). Da es sich um einen T-Zell-Bulk handelt, war es notwendig, in den Versuchen wesentlich mehr T-Zellen einzusetzen als bei dem T-Zell-Klon G484.

2.4.2.1. CTL-Inhibition auf exogen beladenen MCF7-Zellen

Als Target-Zellen dienten 3×10^4 MCF7-Zellen, welche von exogen mit dem Peptid SSX2₄₁₋₄₉ in unterschiedlichen Konzentrationen sowie mit einem Kontrollpeptid beladen wurden. Es wurden 7.000 CD8⁺ SSX2₄₁₋₄₉-spezifische CTLs des Bulks Lau459 als Effektoren eingesetzt. Zum Zeitpunkt des Versuchs enthielt die Linie 97% CD8⁺ T-Zellen. Die Blockade mit Hilfe des epitopspezifischen Fab3 erfolgte in einer fixen Konzentration von 50 µg/ml.

Aus Abbildung 21 geht hervor, dass der epitopspezifische Fab3 eine Inhibition der T-Zell-Antwort bewirkt. Als Vergleichswert hierzu wurde die Anzahl an Spots nach Vorinkubation der antigenpräsentierenden Zellen mit dem Fab-Antikörper 2M3FII, der SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 nicht erkennt, herangezogen.

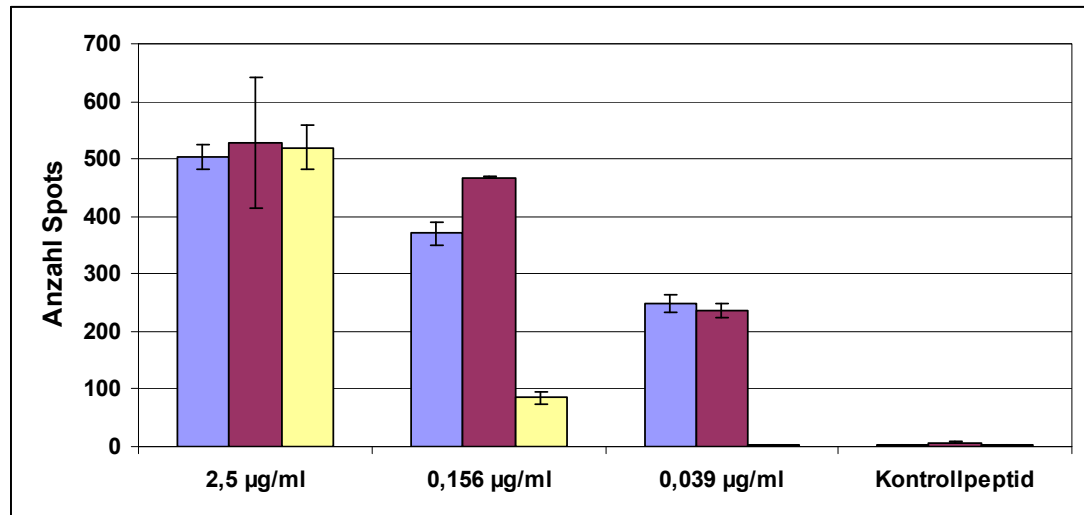


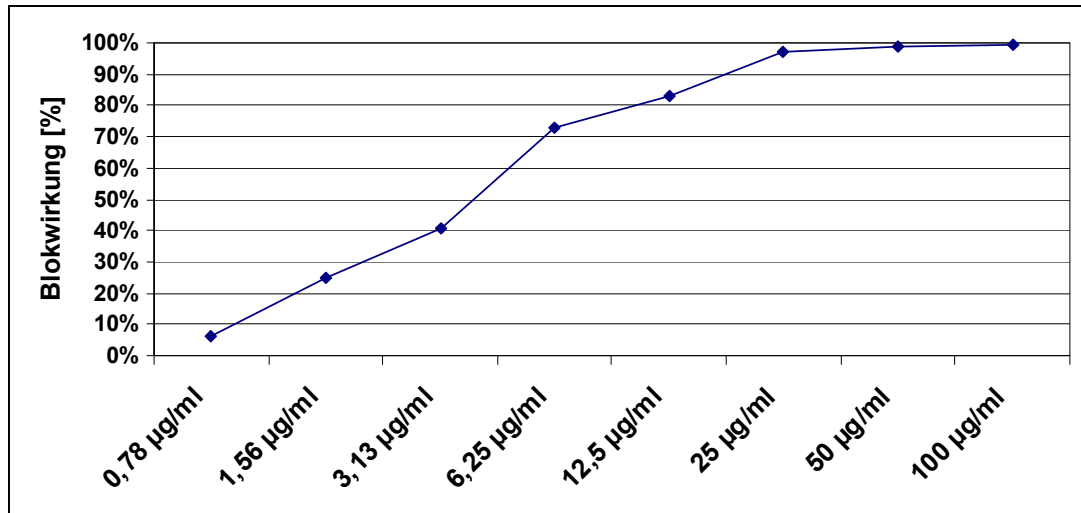
Abb. 21: Spezifische Inhibition der CTL-Reaktivität auf exogen beladenen MCF7-Zellen; HLA-A*0201⁺ MCF7-Zellen wurden mit dem Peptid SSX2₄₁₋₄₉ in den Konzentrationen 2,5 µg/ml, 0,156 µg/ml und 0,039 µg/ml sowie mit dem Kontrollpeptid NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ beladen. Darstellung der CTL-Reaktivität ohne Fab-Antikörper (blau) bzw. nach Coinkubation mit dem Kontrollantikörper 2M3FII (violett) und dem epitopspezifischen Fab3 (hellgelb).

2.4.2.2. CTL-Inhibition auf Me275-Zellen

Als Target-Zellen wurden 3×10^4 Me275-Zellen eingesetzt. Bei diesen Tumorzellen handelt es sich wie bei der Melanomzelllinie SK-Mel-37 um HLA-A*0201⁺ Melanomzellen, die SSX2 endogen prozessieren und auf der Zelloberfläche präsentieren, so dass auch in diesem Fall eine Peptidbeladung entfiel. Bedauerlicherweise konnte nicht mit der gleichen Tumorzelllinie gearbeitet werden, was einen besseren Vergleich zwischen den gegen die beiden verschiedenen SSX2-Epitope gerichteten Antikörpern ermöglicht hätte, da die Bulk-T-Zell-Linie Lau459 nicht gegen SK-Mel-37 reagierte und der SSX2₁₀₃₋₁₁₁-spezifischen T-Zell-Klon G484 keine Reaktivität gegen Me275 zeigte. Es wurden 7.000 CD8⁺ SSX2-spezifische CTLs als Effektoren eingesetzt. Zum Nachweis der Blockade mittels des epitopspezifischen Fab-Antikörpers Fab3 erfolgte eine Fab-Titration in den Konzentrationen 100 µg/ml bis 0,76 µg/ml.

Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch der SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-spezifische Fab3 auf Me275-Zellen dazu in der Lage ist, eine konzentrationsabhängige Inhibition der CTL-Reaktivität hervorzurufen. Folglich ist für diesen Klon ebenso der indirekte Nachweis erbracht, dass er nicht nur auf exogen mit Peptid gepulsten Zellen bindet, sondern auch auf Tumorzellen, welche das Peptid endogen prozessieren und dann auf ihrer Zelloberfläche präsentieren.

A)



B)

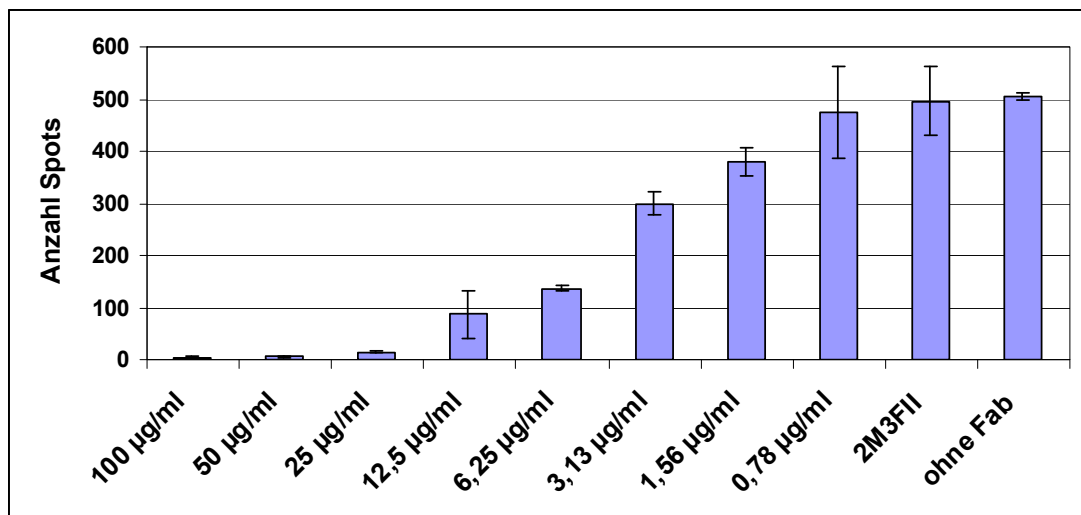


Abb. 22: Spezifische Inhibition der CTL-Reaktivität auf Me275-Zellen; A) Darstellung der prozentualen Blockwirkung des Antikörpers Fab3 bei unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen; **B)** Darstellung der CTL-Reaktivität als Anzahl von Spots ohne Antikörper und nach Coinkubation mit dem Kontrollantikörper 2M3FII bzw. mit Fab3. in unterschiedlichen Konzentrationen.

3. Untersuchung des Phänomens der „in vitro-Binder“

Im Rahmen der Arbeit wurde schon kurz darauf eingegangen, dass insgesamt 4 Antikörper spezifisch mit dem rekombinanten in vitro gefalteten MHC-Peptid-Komplex im ELISA interagierten, jedoch nicht in der Lage waren, auf nativen MHC-Peptid-Komplexe zu binden oder eine CTL-Inhibition hervorzurufen, obgleich sich die Höhe ihrer Signalintensität im ELISA nicht von derjenigen anderer Klone unterschied. Im Gegensatz hierzu erkannten die 12 „Nativ-Binder“ das Epitop im Kontext eines HLA-A*0201 Komplexes sowohl als rekombinant gefaltetes Protein als auch in seiner nativen, auf vitalen Zellen präsentierten Variante. Zusätzlich sind sie in der Lage, exklusiv die Reaktivität spezifischer T-Zellen zu inhibieren. Es wurden mehrere Hypothesen bezüglich dieser Tatsache aufgestellt und experimentell überprüft. Die einzelnen Hypothesen sowie die Resultate ihrer Überprüfung sind im Folgenden näher dargestellt.

3.1. Inhibitionsversuch auf Streptavidin-Beads

Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob die „in vitro-Binder“ dazu in der Lage sind, die Reaktivität CD8⁺ SSX2-spezifischer CTLs zu inhibieren, wenn man die MHC-Peptid-Komplexe an Streptavidin-Beads koppelt. Die Untersuchung zielt darauf ab, die folgenden Fragen zu beantworten: Gibt es zwischen rekombinanten und nativen MHC-Peptid-Komplexen einen strukturellen Unterschied, den lediglich die „in vitro-Binder“ detektieren, oder handelt es sich vielmehr um eine Problematik des Detektionssystems (Durchflusszytometrie versus ELISA)? Ist es prinzipiell auch mit den „in vitro-Bindern“ möglich, die T-Zell-Antwort zu blockieren?

3.1.1. Fab-Interaktion mit MHC-Peptid-gekoppelten Streptavidin-Beads

Zunächst musste der Nachweis erbracht werden, dass die „in vitro-Binder“ auf MHC-Peptid-gekoppelten Beads binden können. Dies geschah, indem man biotinylierte, in vitro gefaltete MHC-Komplexe auf Streptavidin-Beads immobilisierte, die das Peptid-epitop SSX2₁₀₃₋₁₁₁ präsentieren und im Anschluss mit dem jeweiligen Fab-Antikörper färbte. Interagiert der Antikörper mit den MHC-Peptid-gekoppelten Streptavidin-Beads, müsste sich durchflusszytometrisch eine FI-Erhöhung zeigen. Zur Kontrolle wurden die Beads mit CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ / HLA-A*0201 gekoppelt und ebenfalls mit

dem entsprechenden Klon gefärbt. Die Antikörper wurden mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt, der MHC-Peptid-Komplex in einer Konzentration von 2 µg/ml.

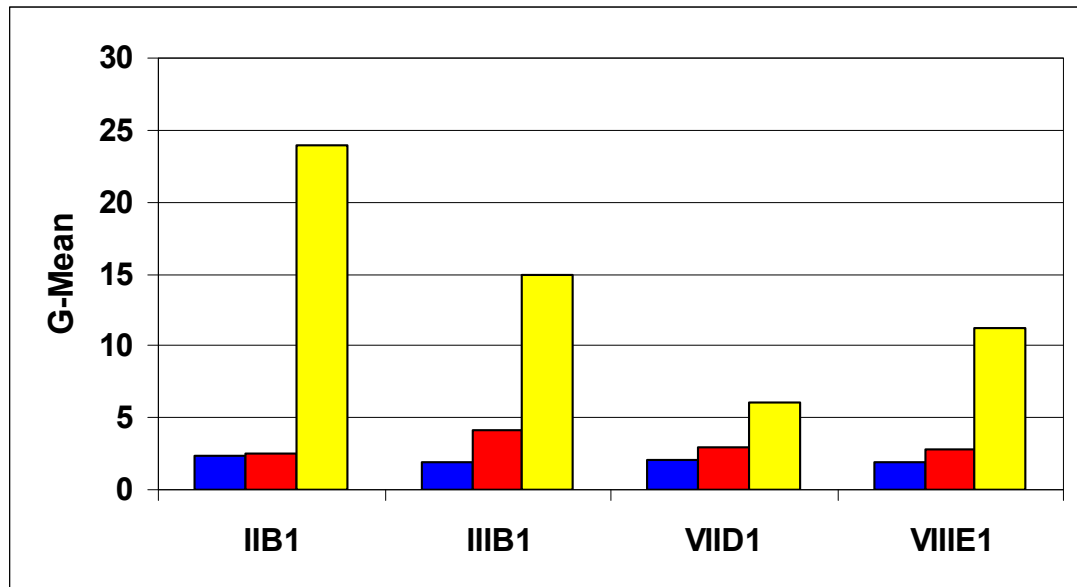


Abb. 23: Bindungsverhalten der „in vitro-Binder“ auf MHC-Peptid-gekoppelten Beads; G-Mean-Werte der Klone IIB1, IIIB1, VIID1 und VIIIE1 auf ungekoppelten Beads (blau), CMV pp65-gekoppelten Beads (rot) und SSX2₁₀₃₋₁₁₁-gekoppelten Beads (gelb)

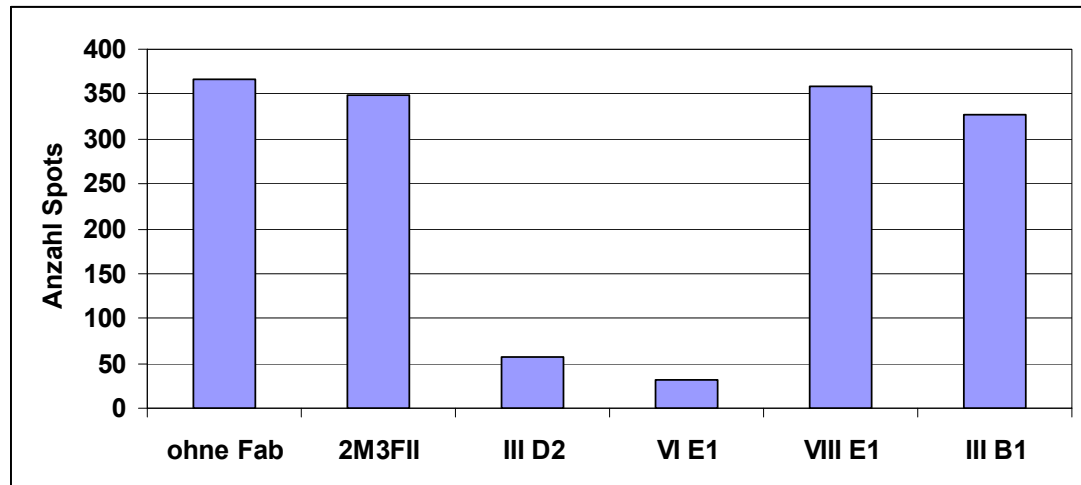
Abbildung 23 zeigt, dass die „in vitro-Binder“ nur auf den mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 gekoppelten Beads eine relevante FI-Änderung hervorrufen.

3.1.2. CTL-Inhibition auf MHC-Peptid-gekoppelten Streptavidin-Beads

Es wurde versucht, die IFN γ -Ausschüttung CD8⁺ SSX2₁₀₃₋₁₁₁-spezifischer CTLs mit den „in vitro-Bindern“ III B1 und VIIIE1 zu inhibieren. Zum Nachweis, dass eine derartige Inhibition auf Streptavidin-Beads prinzipiell möglich ist, wurde parallel hierzu versucht, eine blockierende Wirkung mit den „Nativ-Bindern“ IIID2 und VIE1 zu erzielen. Die Details des Versuchsaufbaus sind im Material- und Methodenteil in Kapitel 10.4 beschrieben. Es wurden 2.500 SSX2₁₀₃₋₁₁₁-spezifische CTLs eingesetzt. Als Endkonzentration für die Fab-Antikörper wurde 50 µg/ml gewählt.

Abbildung 24 kann man entnehmen, dass die „in vitro-Binder“ die Reaktivität epitopspezifischer CTLs nicht inhibieren können, während die Anzahl der Spots nach Coinkubation mit den „Nativ-Bindern“ stark reduziert ist.

A)



B)

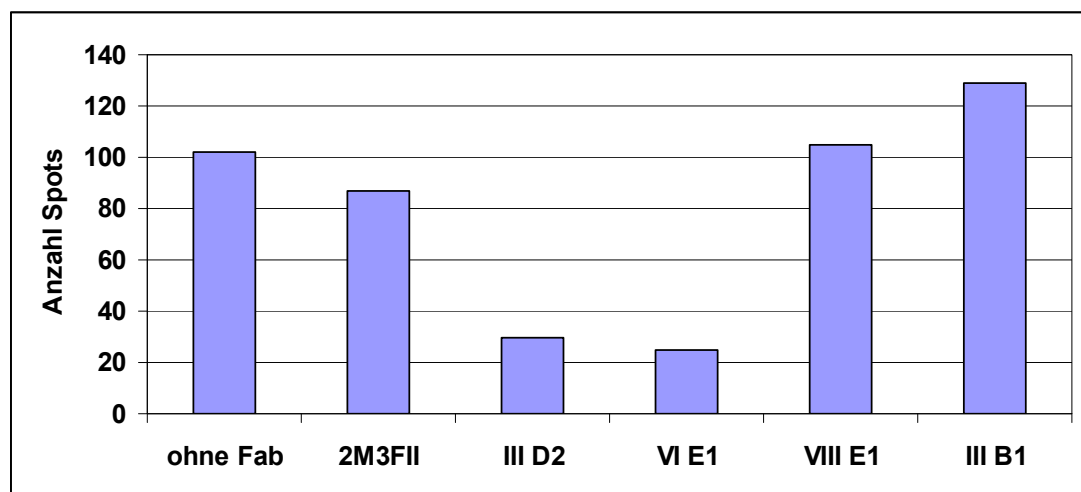


Abb. 24: CTL-Inhibition auf MHC-Peptid-gekoppelten Streptavidin-Beads mit „Nativ-“ und „in vitro-Bindern“; Streptavidin-Beads wurden mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 in den Konzentrationen **A)** 100nM und **B)** 10nM beladen. Darstellung der CTL-Reaktivität ohne Fab-Antikörper bzw. nach Coinkubation mit dem Kontrollantikörper 2M3FII, den „Nativ-Bindern“ IIID2 und VIE1 sowie den „in vitro-Bindern“ VIIIE1 und IIIB1.

3.2. Bindungsmodi der Fab-Antikörper nach Mutagenisierung von SSX2₁₀₃₋₁₁₁

Aus der T-Zell-Immunologie ist bekannt, dass kritische Kontaktpunkte für die MHC-Peptid-T-Zell-Rezeptor-Interaktion existieren. Obwohl die Variabilität der T-Zell-Rezeptoren und die der antigenen Peptide außerordentlich hoch ist, ist der Modus ihrer Interaktion sehr konserviert. Die Gründe hierfür sind nicht verstanden. Da die hier generierten Antikörper in Analogie eines T-Zell-Rezeptors spezifisch ein Peptid im Kontext eines MHC Klasse I-Komplex erkennen, stellte sich die Frage, ob ihr Bin-

ungsmodus dem des T-Zell-Rezeptors entspricht oder ob er sich von ihm unterscheidet.

3.2.1. Bindungsverhalten der Fab-Antikörper nach Glutamatsubstitution

Eine erste Vermutung war, dass die „in vitro-Binder“ eine deamidierte Variante des Peptids SSX2₁₀₃₋₁₁₁ erkennen (McAdam et al., 2001). Eine Deamidierung des Glutamins hätte als spontane chemische Reaktion bei der Faltung der rekombinanten MHC-Peptid-Komplexe ablaufen können, so dass in der Lösung eine nicht-deamidierte und eine deamidierte Form vorgelegen hätten. Somit wären aus der Selektion der Phagenbank Antikörper gegen beide Varianten hervorgegangen. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, indem die Antigen-präsentierenden Zellen mit der deamidierten Variante des Peptides, bei der Glutamin an Position 105 durch Glutamat ausgetauscht ist, gepulst wurden. Die Peptidbeladung erfolgte mit einer Konzentration von 20 µg/ml, die Färbung mit einer Fab-Konzentration von 50 µg/ml. Die sogenannten „in vitro-Binder“ erkannten auch diese MHC-Peptid-Komplexe nicht, wohingegen bei den „Nativ-Bindern“, ein wenn auch schwächeres Signal, detektierbar war.

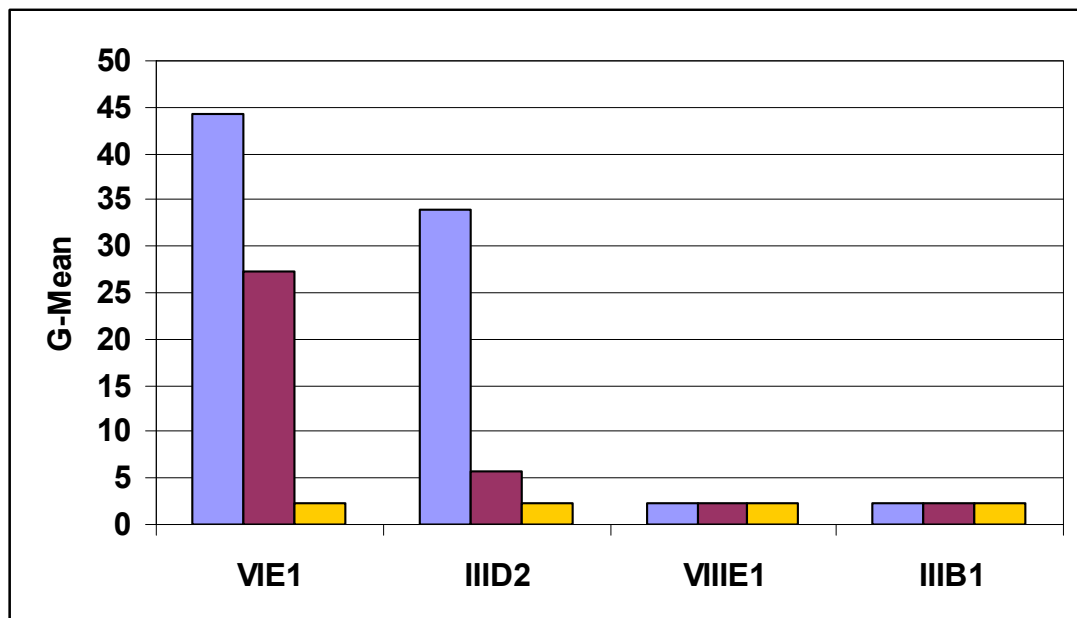


Abb. 25: Bindungsverhalten der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ in der Durchflusszytometrie nach Glutamatsubstitution; Auftragung der G-Mean-Werte der „in vitro-Binder“ VIIIE1 und IIIB1 im Vergleich zu denen der „Nativ-Binder“ VIE1 und IIID2 nach Beladung mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (blau), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ Q105E (violett) und unladen (gelb).

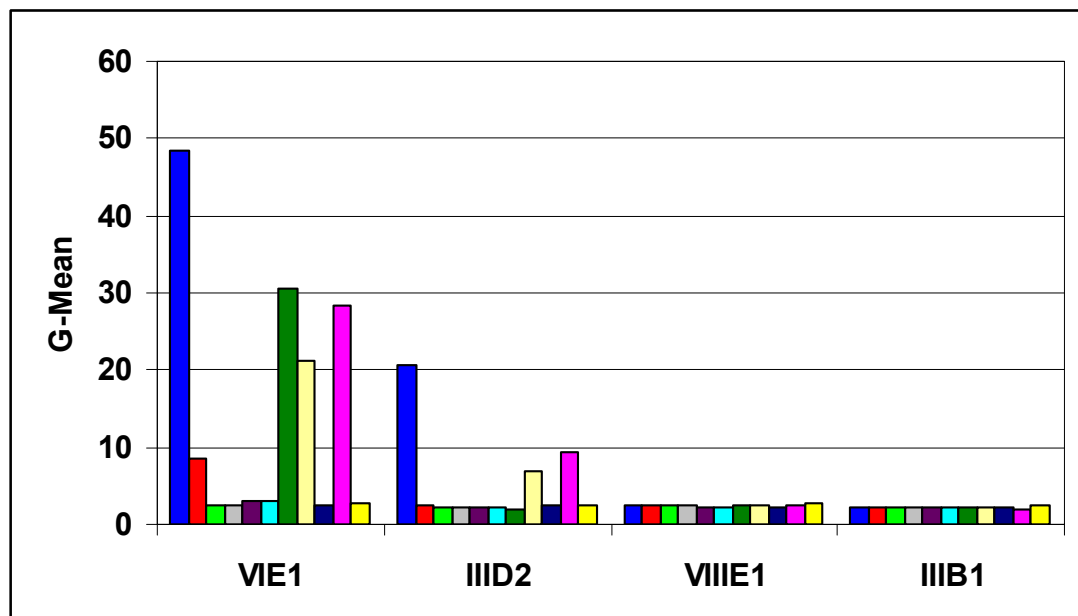
3.2.2. Bindungsverhalten der Fab-Antikörper nach Alaninsubstitution des Peptids SSX2₁₀₃₋₁₁₁

Die Inhibitionsversuche auf MHC-Peptid-gekoppelten Streptavidin-Beads legen eine peptidspezifische Interaktion der „in vitro-Binder“ mit dem MHC-Peptid-Komplex an Kontaktpunkten distinkt von denen eines T-Zell-Rezeptors nahe. Diese Kontaktpunkte sollen exakt durch Mutagenisierung des Peptids bestimmt werden. Die für die T-Zell-Rezeptor-Bindung kritischen Aminosäuren des Peptids liegen überwiegend in seinem zentralen Teil. Es ist zu erwarten, dass die eine T-Zell-Aktivierung inhibierenden Fab-Antikörper ähnlich determiniert sind, während die Antikörper der „in vitro-Binder“ an einer anderen Stelle interagieren.

3.2.2.1. *Bindungsverhalten auf exogen mit Peptid beladenen T2-Zellen*

In einem nächsten Schritt wurde ein sog. „Alanin-Scan“ der einzelnen Antikörper durchgeführt, d.h. die Reaktivität der Fab-Antikörper gegen Alaninvarianten von SSX2₁₀₃₋₁₁₁ durchflusszytometrisch auf peptidbeladenen T2-Zellen untersucht. Die Analysen wurden mit insgesamt 6 „Nativ-“ und 2 „in vitro-Bindern“ durchgeführt:

A)



B)

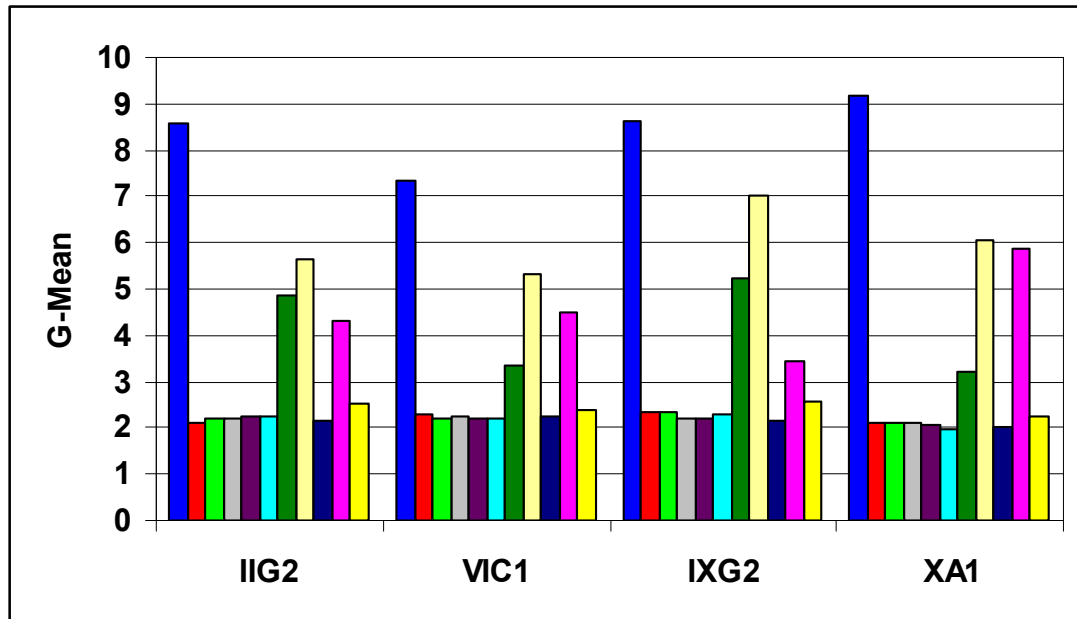


Abb. 26: Bindungsverhalten der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ in der Durchflusszytometrie nach Alaninsubstitution; T2-Zellen wurden unbeladen (gelb) und nach Beladung mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (blau), SSX2 R103A (rot), SSX2 L104A (hellgrün), SSX2 Q105A (grau), SSX2 G106A (violett), SSX2 I107A (türkis), SSX2 S108A (dunkelgrün), SSX2 P109A (hellgelb), SSX2 K110A (dunkelblau); SSX2 I111A (rosa) gefärbt mit **A)** VIE1, IIG2, VIIIE1 und IIGB1 bzw. **B)** IIG2, VIC1, IXG2 und XA1

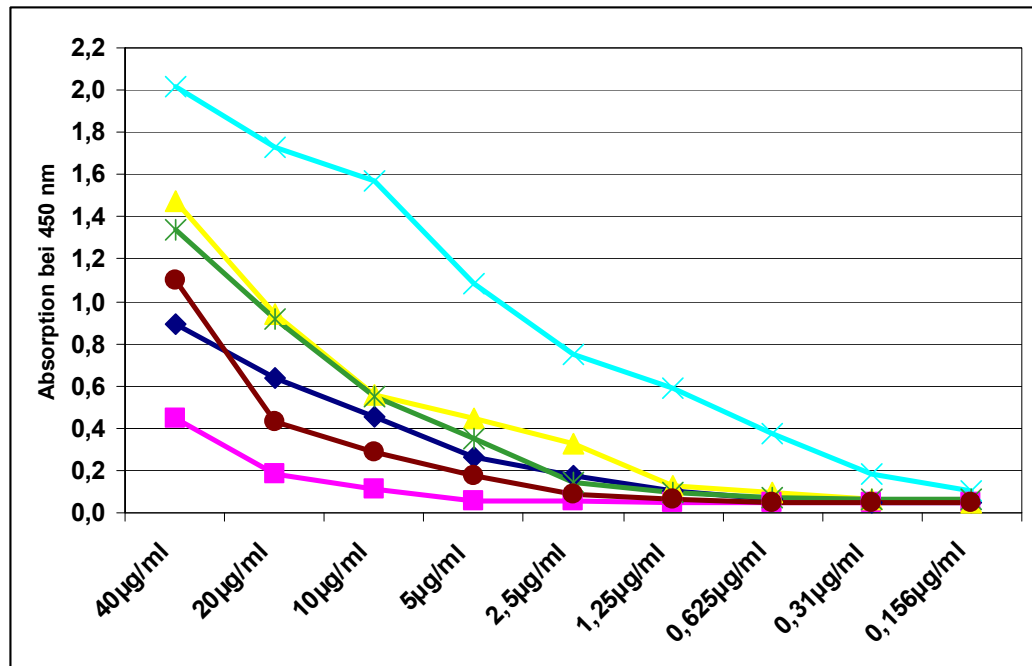
Es konnte nach Färbung mit den „in vitro-Bindern“ keine Änderung des FI-Wertes im Vergleich zu den unbeladenen Zellen detektiert werden. Allerdings fällt bei näherer Betrachtung des Bindungsverhaltens der „Nativ-Binder“ auf, dass die für die spezifische Interaktion mit dem MHC-Peptid-Komplex kritischen Aminosäuren an den Positionen 103 bis 107 und 110 liegen. Im Gegensatz hierzu sind die Fab-Antikörper weiterhin, wenn auch nur geringfügig, in der Lage, an den MHC-Peptid-Komplex zu binden, wenn die T2-Zellen mit einer Alaninmutante des Peptids an den Positionen 108, 109 oder 111 beladen sind. Anhand Abbildung 26 kann man zudem erkennen, dass die Interaktion der Antikörper so hochspezifisch ist, dass allein der Austausch einer Aminosäure genügt, dass die Antikörper nicht mehr binden können.

3.2.2.2. Bindungsverhalten auf rekombinanten biotinylierten MHC-Monomeren im ELISA

Dieser Versuchsaufbau diente dazu, die Reaktivität der Fab-Antikörper gegen rekombinante biotinylierte MHC-Peptid-Komplexe zu untersuchen, die verschiedene Alaninsubstitutionen des Wildtypepitops SSX2₁₀₃₋₁₁₁ präsentieren.

Zunächst wurde zu diesem Zweck eine Fab-Titration aller Antikörper auf dem Originalkomplex SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 angefertigt, um die Konzentrationen zu ermitteln, bei denen sich ein halbmaximales Signal ergab. In Abbildung 27 sind exemplarisch die Kurven von 6 verschiedenen „Nativ-Bindern“ dargestellt sowie im Vergleich hierzu die Kurven von 3 „in vitro-Bindern“:

A)



B)

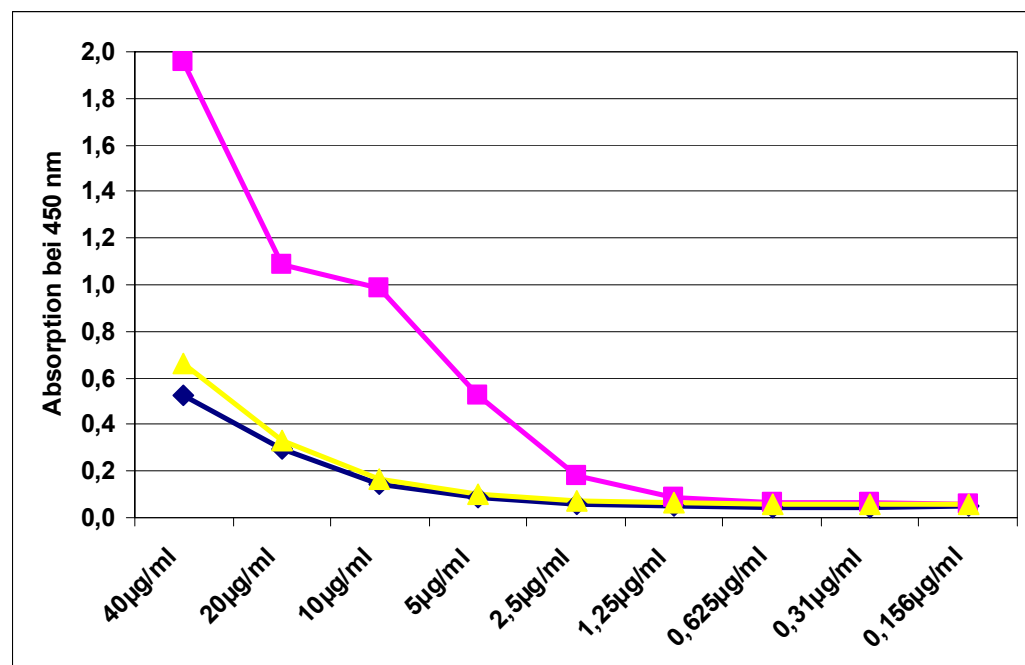


Abb. 27: Fab-Titration der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ im ELISA; Titration der Fab-Antikörper auf dem Originalkomplex SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201; **A)** Titrationskurven der „Nativ-Binder“ VIE1 (türkis), IIID2 (gelb), XA1 (grün), VIC1 (dunkelblau), IXG2 (braun) und XIA1 (rosa); **B)** Titrationskurve der „in vitro-Binder“ VIII E1 (rosa), VIID1 (gelb) und IIIB1 (dunkelblau).

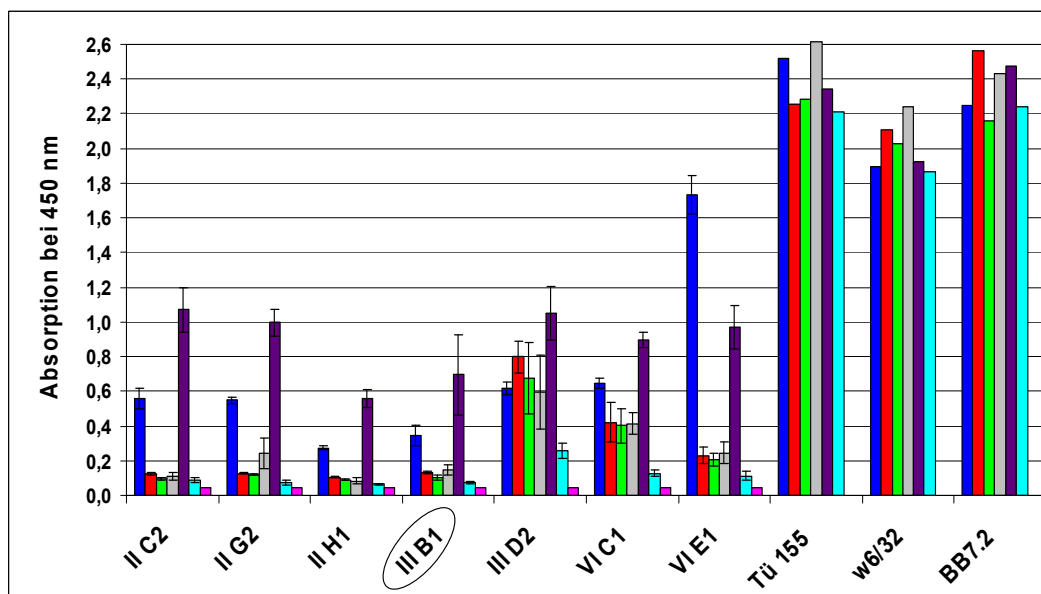
Betrachtet man Abbildung 27, so fällt auf, dass die meisten „Nativ-Binder“ höhere Absorptionswerte aufweisen als die „in vitro-Binder“. Weiterhin kann man sehr gut den Kurvenverlauf des „in vitro-Binders“ VIII E1 (der reproduzierbar einen derartigen Kurvenverlauf aufwies) mit demjenigen des „Nativ-Binders“ VI E1 vergleichen: Die Absorptionswerte bei einer Fab-Konzentration von 40 µg/ml sind fast identisch; allerdings zeigt der Klon VIII E1 einen wesentlich steileren Kurvenabfall als Klon VI E1. Dies suggeriert, dass die „in vitro-Binder“ zwar spezifisch an den MHC-Peptid-Komplex binden, jedoch eine niedrigere Affinität zu diesem aufweisen.

In einem nächsten Schritt wurde die Reaktivität der Antikörper gegenüber den MHC-Peptid-Komplexen mit mutagenisiertem Peptid SSX2₁₀₃₋₁₁₁ überprüft. Da für eine stabile Verankerung des Peptids in der Bindungsgrube des HLA-A*0201 die hydrophoben Seitenketten der zweiten und der C-terminalen Aminosäure von Bedeutung sind, wäre an diesen Positionen eine Alaninsubstitution nicht sinnvoll. Es wurden daher die folgenden Varianten von SSX2₁₀₃₋₁₁₁ zur Faltung rekombinanter MHC-Peptid Komplexe verwendet:

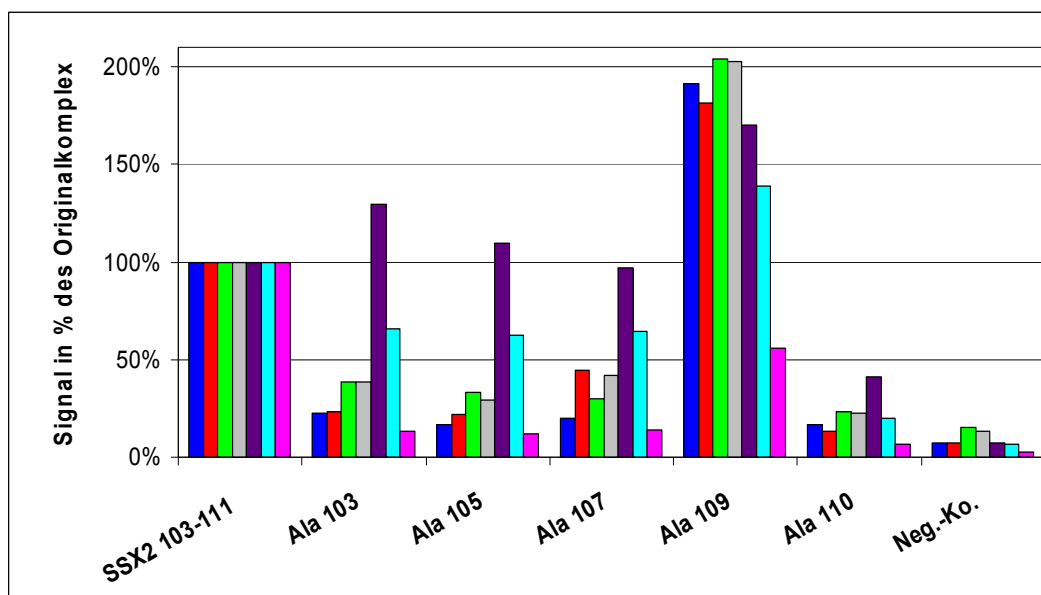
- SSX2₁₀₃₋₁₁₁ R103A / HLA-A*0201 (abgekürzt: Ala 103)
- SSX2₁₀₃₋₁₁₁ Q105A / HLA-A*0201 (abgekürzt: Ala 105)
- SSX2₁₀₃₋₁₁₁ I107A / HLA-A*0201 (abgekürzt: Ala 107)
- SSX2₁₀₃₋₁₁₁ P109A / HLA-A*0201 (abgekürzt: Ala 109)
- SSX2₁₀₃₋₁₁₁ K110A / HLA-A*0201 (abgekürzt: Ala 110)

Die Antikörper wurden, wie oben erwähnt mit der Konzentration eingesetzt, bei der sie ein halbmaximales Signal ergaben. Es wurden zur Erhöhung der Validität Dreifachbestimmungen durchgeführt und die sich hierbei ergebenden Mittelwerte und Standardabweichungen aufgetragen. Weiterhin wurde die Signalthöhe als prozentualer Anteil des Signals aufgetragen, das sich gegenüber dem Originalkomplex ergab.

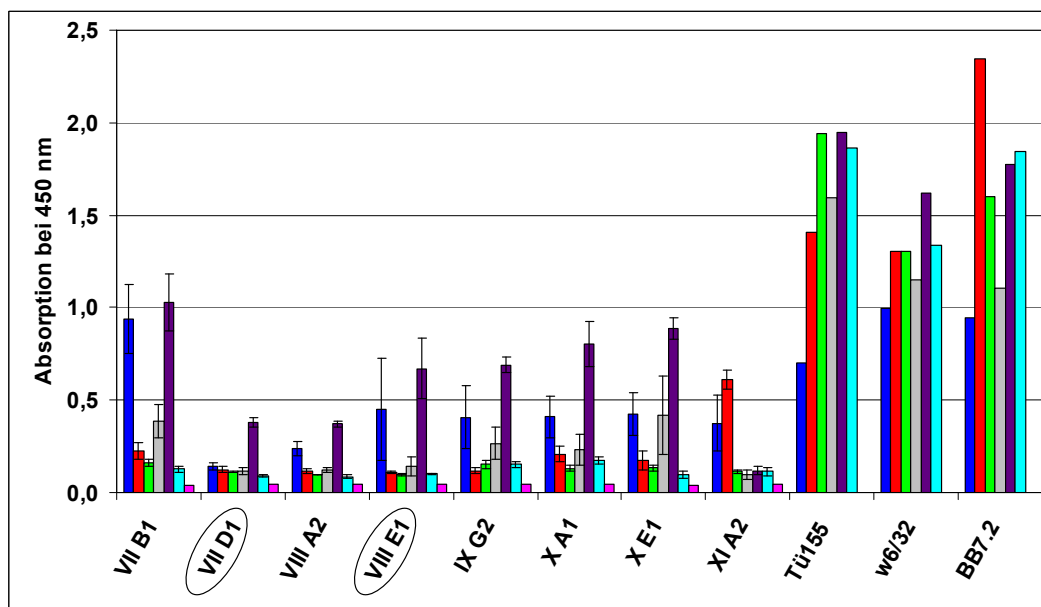
A)



B)



C)



D)

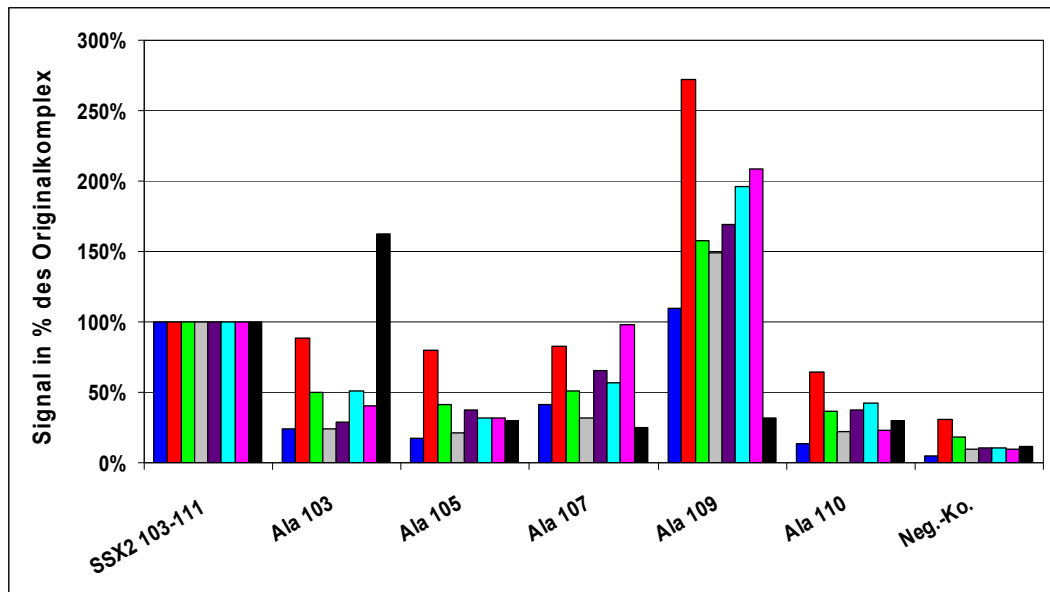


Abb. 28: Bindungsverhalten der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ im ELISA nach Alaninsubstitution; **A)** Reaktivität der Klone IIC2, IIG2, IIH1, IIB1 (eingekreister „in vitro-Binder“), IID2, VIC1, VIE1 sowie der Positivkontrollen Tü155, w6/32 und BB7.2 gegen SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 (blau), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ R103A / HLA-A*0201 (rot), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ Q105A / HLA-A*0201 (hellgrün), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ I107A / HLA-A*0201 (grau), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ P109A / HLA-A*0201 (lila), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ K110A / HLA-A*0201 (türkis); Negativkontrolle (rosa); **B)** Darstellung der Signalthöhe der Klone IIC2 (blau), IIG2 (rot), IIH1 (hellgrün), IIB1 (grau), IID2 (lila), VIC1 (türkis) und VIE1 (rosa) auf den alaninsubstituierten Komplexen als prozentualer Absorptionswert des Originalkomplexes; **C)** Reaktivität der Klone VIIB1, VIID1 (eingekreister „in vitro-Binder“), VIIIA2, VIIIE1 (eingekreister „in vitro-Binder“), IXG2, XA1, XE1, XIA2 sowie der Positivkontrollen Tü155, w6/32 und BB7.2 gegen SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 (blau), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ R103A / HLA-A*0201 (rot), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ Q105A / HLA-A*0201 (hellgrün), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ I107A / HLA-A*0201 (grau), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ P109A / HLA-A*0201 (lila), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ K110A / HLA-A*0201 (türkis); Negativkontrolle (rosa); **D)** Darstellung der Signalthöhe der Klone VIIB1 (blau), VIID1 (rot), VIIIA2 (hellgrün), VIIIE1 (grau), IXG2 (lila), XA1 (türkis), XE1 (rosa) und XIA2 (schwarz) auf den alaninsubstituierten Komplexen als prozentualer Absorptionswert des Originalkomplexes

Die in Abbildung 28 dargestellten Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu: Erstens lässt sich bei allen Antikörperklonen eine deutliche Steigerung der Signalthöhe durch eine Alaninsubstitution des SSX2-Peptids an Position 109 erzielen. Zweitens sind die Klone IID2 und VIC1 durch eine Alanin-Substitution im Epitop in ihrer MHC-Peptid-spezifischen Interaktion mit dem HLA-A*0201 Komplex weniger zu beeinflussen. Drittens kann man keinen systematischen Unterschied zwischen dem Bindungsmuster der „Nativ-“ und demjenigen der „in vitro-Binder“ erkennen. Zieht man weiterhin die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2.1 in die Betrachtungen mit ein, kann man feststellen, dass auch bei den exogen beladenen T2-Zellen, die FI am

stärksten bei der Alaninsubstitution an Position 109 war. Interessanterweise war die FI des Originalpeptids jedoch bei exogener Beladung immer höher als bei den Peptidmutationen.

3.3. Bindungsmodi der Fab-Antikörper nach Mutagenisierung der HLA-A*0201-Schwerkette

Die bisherigen Vorarbeiten erbrachten keine Evidenz für eine unterschiedliche Interaktion der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ mit dem MHC-Peptid-Komplex; daher sollten in einem weiteren Schritt die Kontaktpunkte durch Mutagenisierung der Schwerkette des HLA-A*0201-Komplexes näher bestimmt werden.

Die für eine T-Zell-Aktivierung relevanten Kontaktpunkte der HLA-A*0201 Schwerkette sind bereits ausführlich untersucht. Durch die große Diversität des T-Zell-Rezeptor- und Peptid-Repertoires stellt jede Bindung eine individuelle Interaktion, ohne Ausbildung einheitlicher Kontaktpunkte, dar. Es bestehen jedoch einige „hot spots“, die präferentiell mit dem T-Zell-Rezeptor interagieren. Sie befinden sich in der α_1 - und α_2 -Domäne, konkret sind dies Arg65, Lys66 und Gln155, welche zu Alanin mutagenisiert wurden (Baker et al., 2001; Rudolph et al., 2006).

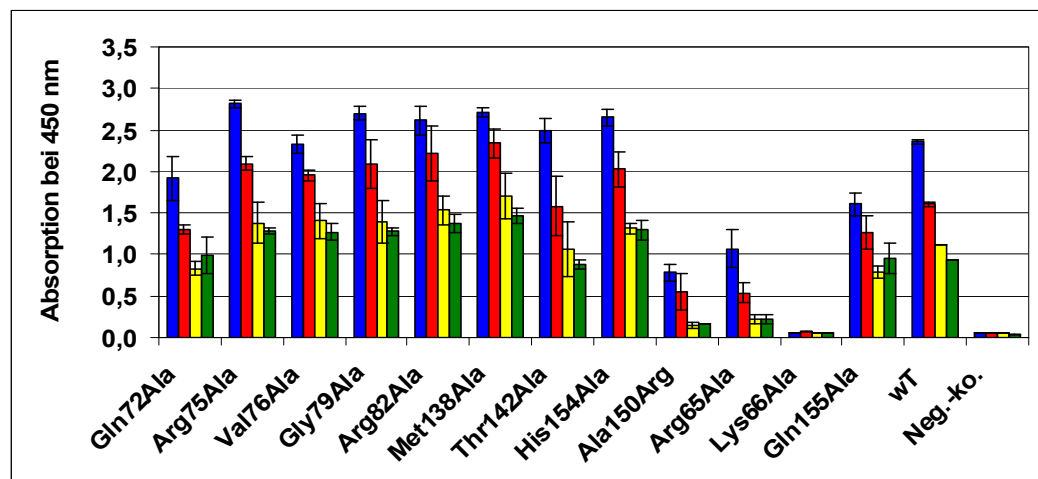
Alle mutagenisierten Varianten des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 Komplex wurden als rekombinantes, in vitro gefaltetes Antigen im ELISA eingesetzt, um ihre Interaktion mit allen MHC-Peptid-spezifischen Antikörpern systematisch zu untersuchen. Es sollte ein „Footprint“ der auf dem MHC-Komplex gebundenen Antikörper erstellt werden. Bei der Auswahl der Residuen der HLA-A*0201-Schwerkette sind solche zu wählen, deren Austausch wahrscheinlich nicht die Peptidbindung beeinflusst. Es wurden infolgedessen die nachgenannten Mutationen an der HLA-A*0201-Schwerkette eingeführt:

- | | | |
|------------|-------------|-------------|
| • Arg65Ala | • Val76Ala | • Thr142Ala |
| • Lys66Ala | • Gly79Ala | • His145Ala |
| • Gln72Ala | • Arg82Ala | • Ala150Arg |
| • Arg75Ala | • Met138Ala | • Gln155Ala |

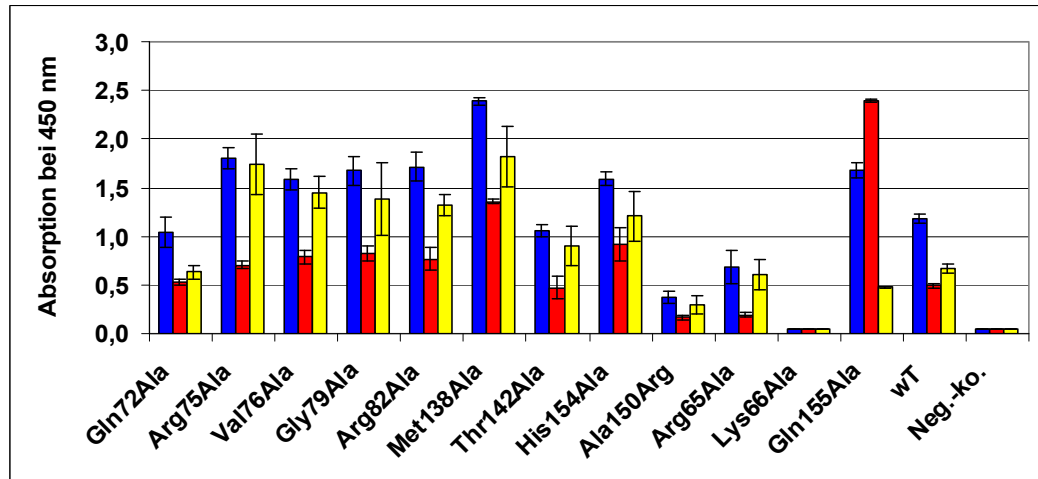
Die Fab-Antikörper und die MHC-Peptid-Komplexe wurden in der gleichen Konzentration wie in Kapitel 3.2.2.2 eingesetzt. Ebenso wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte und Standardabweichungen aufgetragen.

Aufgrund der Tatsache, dass bei dieser Versuchsreihe die Stabilität und die korrekte Faltung des MHC-Peptid-Komplexes von entscheidender Bedeutung sind, wurden auf jeder ELISA-Platte, auf der jeweils ein Antikörper auf seine Bindungsfähigkeit gegenüber den verschiedenen Komplexen überprüft wurde, zwei Positivkontrollen mitgeführt. Somit lagen bei insgesamt 15 getesteten Fab-Antikörpern am Ende jeweils 15 Werte für die Positivkontrollen BB7.2 und w6/32 vor, deren Mittelwerte und Standardabweichungen in Abbildung 31D dargestellt sind. Hierbei erkennt der monoklonale HLA Klasse I-Antikörper w6/32 die $\alpha 3$ - und $\alpha 2$ -Domäne sowie das β_2 -Mikroglobulin (Barnstable et al., 1978), und der monoklonale Antikörper Tü155 (Hutter et al., 1996) vor allem peptidbeladene HLA-A*0201-Komplexe. Bezüglich der Komplexstabilität kann man aus Abbildung 31D entnehmen, dass die etwas geringeren Signale, welche die einzelnen Antikörper auf dem Originalkomplex ergeben, wohl durch eine geringere Stabilität des Komplexes zum Zeitpunkt der Versuchsreihe bedingt sind. Weiterhin scheint die Mutation Arg75Ala eine Verschlechterung der Peptidbindung zur Folge zu haben, was sich anhand eines reduzierten Signals des monoklonalen Tü155, trotz eines guten Signals des w6/32, zeigt. Interessanterweise hat dies jedoch keinen Einfluss auf die Bindung der Fab-Antikörper, die ein sehr starkes Signal auf dem Komplex ergeben.

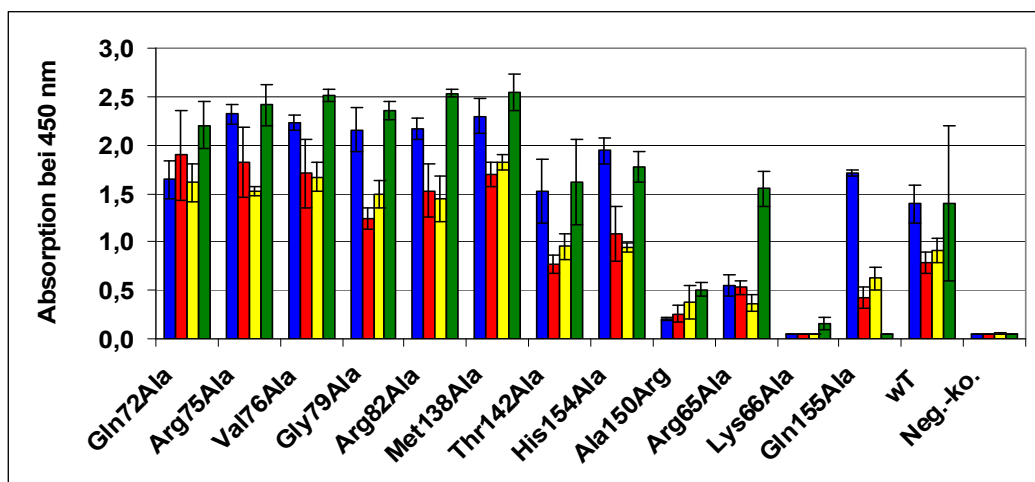
A)



B)



C)



D)

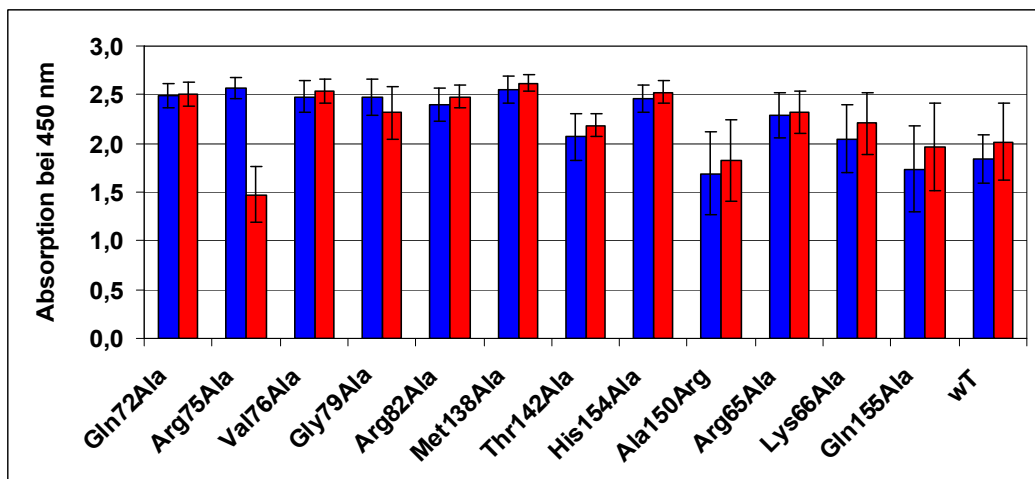


Abb. 29: Bindungsverhalten der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ im ELISA nach Mutagenisierung der HLA-A*0201-Schwerkette; Reaktivität der Fab-Klone nach Mutagenisierung der HLA-A*0201-Schwerkette. **A)** VIE1 (blau), IIID2 (rot), IIIB1 (gelb), VIIIE1 (grün); **B)** VIIB1 (blau), VIID1 (rot), VIIIA2 (gelb); **C)** IXG2 (blau), XA1 (rot), XE1 (gelb), XIA2 (grün); **D)** Positivkontrollen w6/32 (blau) und Tü155 (rot)

Die nachfolgende Abbildung dient dazu, einen allgemeinen Überblick über die Positionen zu geben, an denen die einzelnen Mutagenisierungen eingeführt worden sind sowie deren Auswirkungen auf das Bindungsverhalten zweier „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ darzustellen:

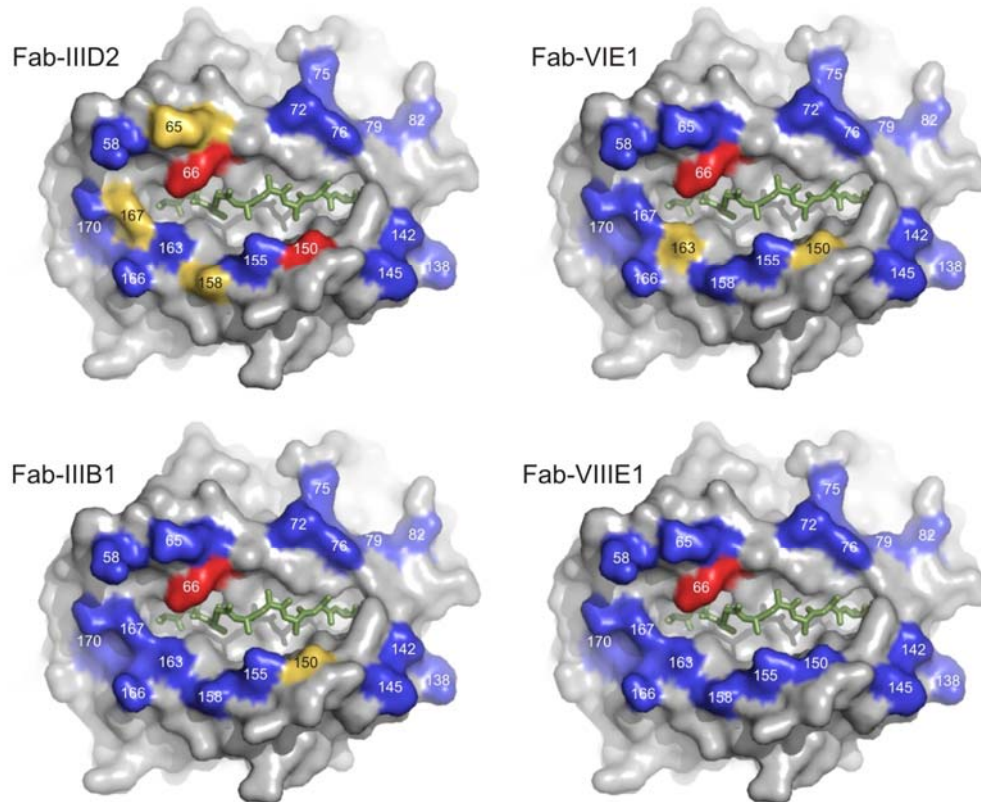


Abb. 30: Model eines HLA-A*0201-Komplexes mit Darstellung der Effekte verschiedener Mutagenisierungen der HLA-A*0201-Schwerkette auf das Bindungsverhalten zweier „Nativ-“ und „in vitro-Binder“; folgende Farbkodierung wurden für den Effekt auf das Bindungsverhalten der Fab-Antikörper verwendet: Rot = starker Effekt; Blau = kein Effekt; Gelb = schwacher Effekt

Es lassen sich aus der Versuchsreihe einige Erkenntnisse gewinnen: Erstens sind die Positionen Ala150, Arg65 und insbesondere Lys66 für die MHC-Peptid-spezifische Interaktion der hier selektierten Fab-Antikörper verantwortlich. Die Mutation Lys66Ala hat sogar einen gänzlichen Bindungsverlust aller Klone zur Folge. Zweitens lässt sich wiederum kein systematischer Unterschied bezüglich des Bindungsverhaltens der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ erkennen. Allein der Antikörper XIA2 zeigt auch eine gute Bindung nach Mutation von Arg65 zu Ala65. Es ist bekannt, dass sich auch die für die T-Zell-Aktivierung relevanten Kontaktpunkte in diesem Bereich der α_1 - und α_2 -Domäne der HLA-A*0201-Schwerkette befinden. Daher kommt man zu dem

Schluss, dass die selektionierten Fab-Antikörper das gleiche Bindungsmuster aufweisen, wie T-Zellen, was die Erkenntnis stützt, dass sie erstens eine T-Zell-Inhibition hervorrufen können und zweitens in Analogie eines T-Zell-Rezeptors spezifisch ein Peptid im HLA-A*0201-Kontext erkennen. Zudem ist die ursprüngliche Hypothese, dass sich die peptidspezifische Interaktion der „in vitro-Binder“ mit dem MHC-Peptid-Komplex von derjenigen eines T-Zell-Rezeptors unterscheidet, widerlegt.

4. Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion

Unter einer Biotinylierung versteht man eine molekularbiologische Methode, bei der ein bestimmtes Molekül, im vorliegenden Fall ein Antikörper, kovalent mit Biotin verbunden wird.

Eine derartige Biotinylierung bietet den Vorteil, dass die Antikörper nicht mehr mittels einer langen Kaskade detektiert werden müssen, was sehr zeitintensiv ist, sondern direkt über einen Streptavidin-gekoppelten Farbstoff gefärbt werden können. Im Rahmen dieses direkten Entwicklungssystems nutzt man aus, dass die Streptavidin-Biotin-Bindung eine der stärksten bekannten nichtkovalenten Bindungen darstellt. Ein weiterer Vorteil der geringeren Anzahl an Färbeschritten stellt eine Reduktion des Hintergrundes dar. Jeder eingesetzte Antikörper hat nämlich die Potenz, unspezifisch mit anderen Bindungspartnern zu interagieren, was einen unerwünschten „Hintergrund“ hervorruft. Je mehr Entwicklungsschritte man benötigt, desto größer wird folglich das Hintergrundsignal, und desto schwieriger ist es, ein möglicherweise sehr geringes Signal zu interpretieren.

Aus den genannten Gründen kam der Wunsch auf, jeweils den Antikörper mit der höchsten Spezifität und Affinität gegen den SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201- bzw. SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex zu biotinylieren, ohne dabei einen Funktions- und Affinitätsverlust in Kauf nehmen zu müssen.

Eine Biotinylierung der Fab-Antikörper kann nun auf zwei Wege erfolgen:

- Chemische in-vitro-Biotinylierung
- Enzymatische in-vivo-Biotinylierung

Die erstgenannte Methode der chemischen Biotinylierung erfolgt in der Regel mit Hilfe der Substanz NHS-SS-Biotin. Diese ist dazu in der Lage, Proteine mit primärer Aminogruppe, beispielsweise die Aminosäure Lysin oder mit endständiger NH₂-

Gruppe, zu biotinylieren. Eine Steuerung des Biotinylierungsgrades erfolgt bei diesem Verfahren über die molare Ratio zwischen Biotin und Protein, die zwischen 5:1 und 20:1 liegen kann. Der Vorteil liegt darin, dass es sich um eine sehr einfache Reaktion handelt. Die Methode birgt jedoch den Nachteil, dass der Ort der Biotinylierung nur bedingt beeinflussbar ist. Die Folge hiervon ist, dass die Biotinylierung von Lysinresten in strukturell oder funktionell wichtigen Domänen zu einer deutlichen Änderung der Proteineigenschaften führen kann (Hoyer-Hansen et al., 2000).

Die zweite Möglichkeit ist eine enzymatische in-vivo-Biotinylierung, bei der das BirA-Enzym, eine Biotin-Ligase, die ursprünglich in *E. coli* identifiziert wurde, verwendet wird. Dieses Enzym katalysiert ausschließlich die Entstehung einer Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Biotin sowie der ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes, einer sogenannten „biotin acceptor domain“ (BAD). In vivo wird als einziges bekanntes Protein das sogenannte „biotin carboxyl carrier protein“ (BCCP) biotinyliert (Shenoy et al., 1988). Jedoch war es möglich, das BCCP auf eine für die Biotinylierung durch das BirA-Enzym spezifische Sequenz von insgesamt 15 Aminosäuren zu reduzieren (Schatz, 1993). Diese ist ausreichend, um im Sinne einer BAD das natürliche Substrat des Enzyms zu imitieren und eine Biotinylierung zu ermöglichen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass es zu einer gerichteten, spezifischen Biotinylierung des Lysinrestes in der BAD kommt. Gleichzeitig wird garantiert, dass durch enzymatische Biotinylierung 85-95% der jeweiligen Proteine mit einem Biotin versehen werden.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass enzymatisch biotinylierte Proteine nach Bindung an Streptavidin eine gleichartige räumliche Ausrichtung erfahren und somit als ideales Antigen im ELISA Verwendung finden können (Ivanov et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, da es bereits in *E. coli* zur Produktion biotinylierter Fab-Antikörper kommt.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion (BirA-tag) in den pCES-Vektor der beiden MHC-Peptid-spezifischen Fab-Antikörper VIE1 (SSX2₁₀₃₋₁₁₁) und Fab3 (SSX2₄₁₋₄₉) kloniert. Wird der die Biotin-Akzeptor Domäne enthaltene Fab-Antikörper anschließend in einem die Biotin-Ligase überexprimierenden *E. coli*-Stamm in Anwesenheit von Biotin exprimiert, kommt es zu dessen Biotinylierung. Im konkreten Fall wurde der Stamm AVB-101 (Avidity, Denver, CO)

verwendet, der mit einem die Biotin-Ligase BirA kodierenden Plasmid kotransfiziert wurde (Cloutier et al., 2000).

In der nachfolgenden Abbildung sind die ursprüngliche Vektorkarte des Phagemid-Vektors pCES-1 sowie das ausgeschnittene Produkt und das neue Insert dargestellt:

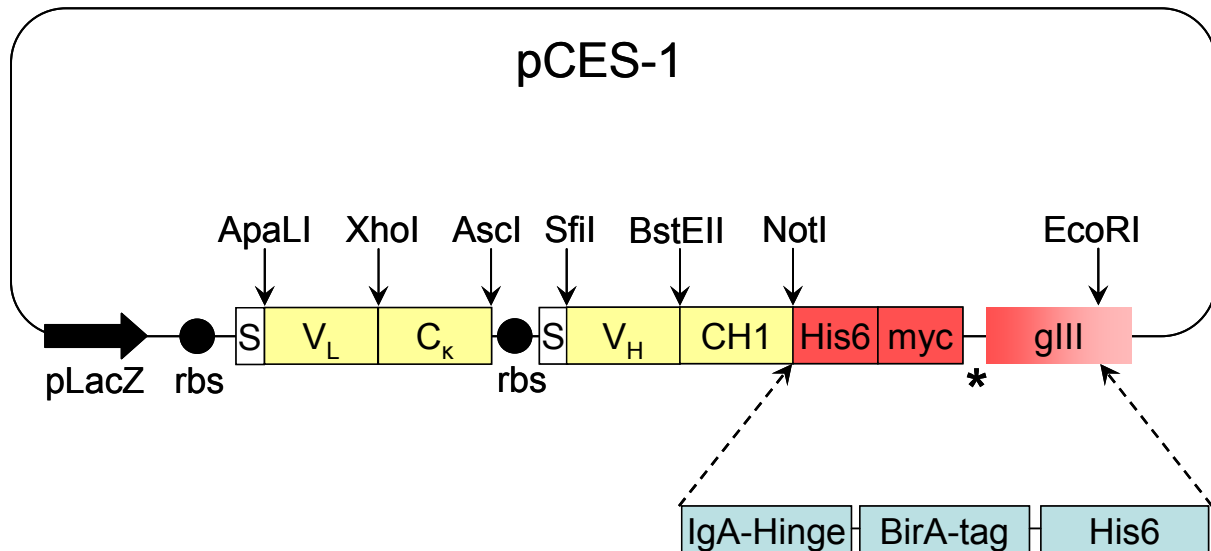


Abb. 31: Vektorkarte des Phagemid-Vektors pCES-1 vor und nach Klonierung der BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion; Dargestellt sind das ausgeschnittene Produkt (rot), das inserierte Produkt (hellblau), sowie die Schnittstellen NotI und EcoRI (gestrichelte Pfeile). pLacZ: LacZ-Promotor, über den die Expression löslicher Fab-Antikörper gesteuert wird; rbs: Ribosomenbindungsstelle (ribosomal binding site); S: Signalsequenz; His6: Hexa-Histidin-tag; myc: c-myc-tag; IgA-Hinge: IgA-Gelenkregion; BirA-tag: Biotin-Akzeptor-Domäne; V_L: variable Region der Leichtkette; C_k: konstante Region der Leichtkette (im dargestellten Fall kappa-Kette); V_H: variable Region der Schwerkette; C_H: konstante Region der Schwerkette; ApaLI, XhoI, AscI, SfiI, BstE1, NotI und EcoRI: Schnittstellen der Restriktionsenzyme

In einem ersten Schritt wurde aus den Bakterienkulturen der Klone VIE1 und Fab3 das Plasmid isoliert und gereinigt. Im Anschluss wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen NotI und EcoRI durchgeführt. Im Folgenden ist das Agarosegel der Klone VIE1 und Fab3 dargestellt.

Die Bande bei 1.250 bp entspricht dem aus dem pCES-1-Vektor ausgeschnittenen Fragment, welches für den His-tag, den c-myc-tag und einen Großteil des Proteins III kodiert. Die Bande bei 4.700 bp entspricht dem restlichen pCES-Vektor.

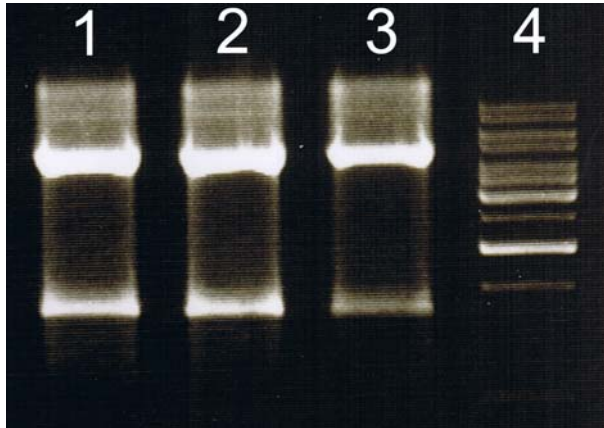


Abb. 32: Restriktionsverdau der Klone VIE1 und Fab3 mittels NotI und EcoRI; 1,5%-Agarose-Gel zur Kontrolle des Restriktionsverdaus der Klone VIE1 (1) und Fab3 (2); Positivkontrolle: irrelevanter biotinylierter Fab-Antikörper (3); Längenmarker Gene Ruler 1kb Ladder (4)

Das zu klonierende Fragment mit einer Größe von 4.700 bp wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gereinigt und einer Ligation unterzogen, bei der mit Hilfe der Restriktionsenzyme NotI und EcoRI die IgA-Hinge (14 AS), der BirA-tag (15 AS) und der His-tag (6 Histidine) eingefügt wurden. Nach Transformation in den kompetenten *E. coli*-Stamm TG1 erfolgte eine Kontrolle der Ligation mittels PCR.

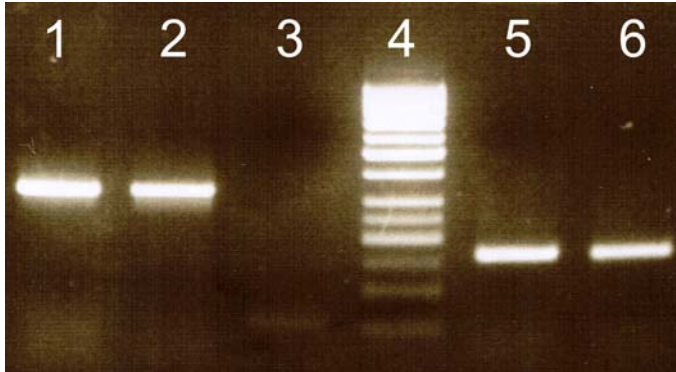


Abb. 33: 1,5% Agarose-Gel zur Kontrolle der Klonierung des BirA-tags; Links: Kontroll-PCR der Klone Fab3 (1) und VIE1 (2) mit den Primern 5'CH1 rev. und 3'BirAtag EcoRI; Mitte: Negativkontrolle: unbiotinylierter Fab-Antikörper (3), Längenmarker Gene Ruler 1kb Ladder (4); Rechts: Kontroll-PCR der Klone Fab3 (5) und VIE1 (6) mit den Primern 5'BirAtag Not und 3'BirAtag EcoRI

Bei beiden Klonen ist im Agarose-Gel sowohl mit den Primern 5'CH1 rev. und 3'BirAtag EcoRI als auch mit den Primern 5'BirAtag Not und 3'BirAtag EcoRI, welche allein das BirA-tag amplifizieren, jeweils eine Bande sichtbar. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einer Bindung des 3'Primers im neu klonierten BirA-Tag gekommen sein muss. Die Ligation kann somit als erfolgreich bezeichnet werden.

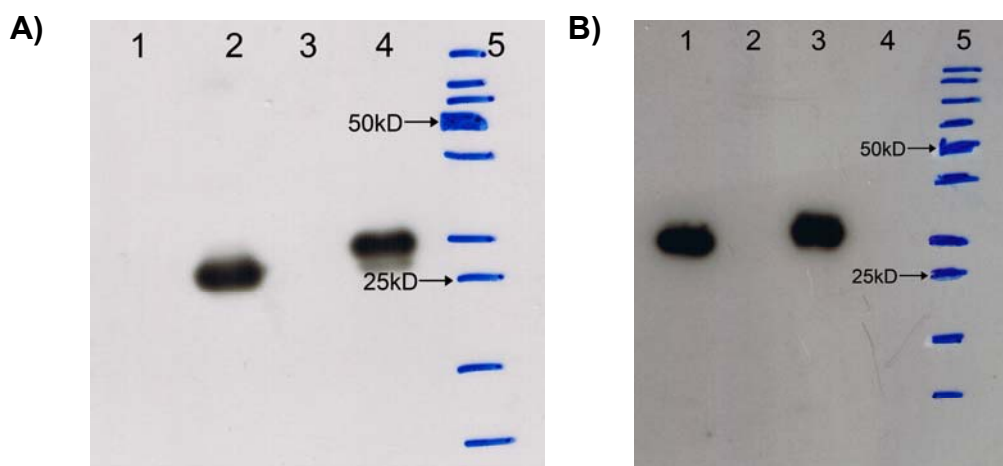
In einem nächsten Schritt wurde das Plasmid in den *E. coli*-Stamm AVB101 transformiert und die löslichen, biotinylierten Fab-Antikörper VIE1-b und Fab3-b produziert. Mit Hilfe eines SDS-Gels wurde überprüft, ob die Fab-Antikörper weiterhin ihr charakteristisches Bandenmuster aufwiesen.

Der Western-Blot diente dem Nachweis, dass die Fab-Antikörper tatsächlich Biotin tragen. Es wurden insgesamt drei Western-Blots angefertigt, bei denen die zu testenden Fab-Antikörper einmal in ihrer unbiotinylierten und einmal in ihrer biotinylierten Form vergleichend aufgetragen wurden. Alle Fab-Antikörper lagen in ihrer reduzierten Form vor. Im ersten Fall erfolgte die Entwicklung unter Anwendung des murinen Antikörper anti-c-myc (Klon 9E10) sowie anti-Maus-Ig-POX, wodurch einzig die unbiotinylierten Fab-Antikörper mit noch vorhandenem c-myc-tag als Bande sichtbar wurden.

Im zweiten Fall erfolgte die Färbung mittels Streptavidin-POX. Es stellten sich in diesem Fall nur die biotinylierten Fab-Antikörper als Bande dar, da das Streptavidin direkt an das Biotin des jeweiligen Antikörpers binden kann.

Im dritten Fall wurde eine Färbung mit dem murinen Antikörper anti-His vorgenommen, welcher sowohl an die biotinylierte als auch an die unbiotinylierte Variante des Fab-Antikörpers binden kann, da beide Formen ein His-tag enthalten. Somit kommen bei dieser Art der Entwicklung der biotinylierte und der unbiotinylierte Antikörper zur Darstellung.

Im Folgenden sind die drei Western-Blots dargestellt:



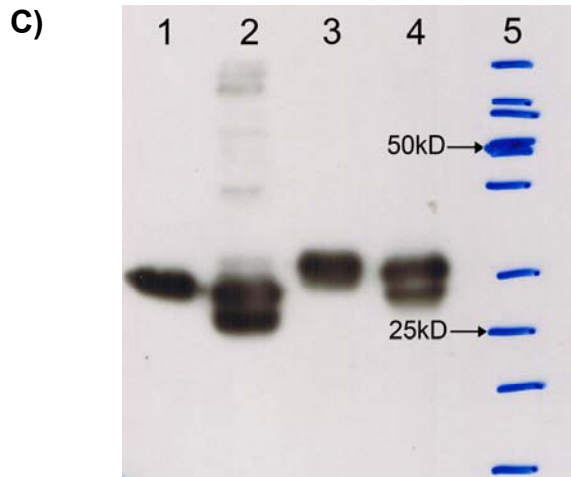


Abb. 34: Western-Blot der Fab-Antikörper Fab3-b (1), Fab3 (2), VIE1-b (3), VIE1 (4); Entwicklung mit **A)** anti-c-myc (Klon 9E10) und anti-Maus-HRP; **B)** Streptavidin-HRP; **C)** anti-his und anti-Maus-HRP; Längenmarker: PageRuler™ (5)

5. Sensitivitätsanalysen

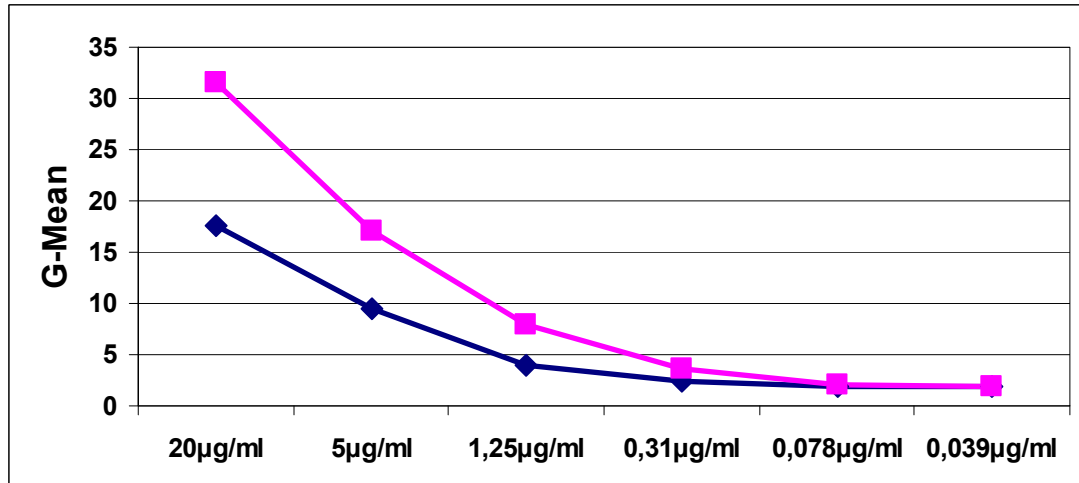
5.1. Titration der Peptide SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉

Mit den biotinylierten und unbiotinylierten Fab-Antikörpern gegen die beiden Epitope des SSX2-Proteins wurden in einem nächsten Schritt Färbungen auf exogen beladenen Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden hierbei mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen des jeweiligen Epitops gepulst. Beide Fab-Antikörper wurden in einer fixen Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt.

5.1.1. Peptidtitration auf T2-Zellen

Diese Versuchsreihe hatte einerseits zum Ziel, einen Funktions- oder Affinitätsverlust der Antikörper nach der Biotinylierung auszuschließen, andererseits sollte die Sensitivität, mit der die Antikörper in der Lage waren, den entsprechenden MHC-Peptid-Komplex zu detektieren, verglichen werden. Von Interesse war vor allem auch die Frage, ob für diesen direkten Nachweis infolge einer verkürzten Färbekaskade eine erkennbare Reduktion der Signalstärke in Kauf genommen werden muss und, falls ja, ob diese tolerierbar ist. Das Peptid wurde von 20 µg/ml sukzessiv bis zu einer Konzentration von 0.039 µg/ml verdünnt. Die folgende Abbildung stellt die Peptidtitrationskurven der Antikörper Fab3, Fab3-b, VIE1 und VIE1-b dar:

A)



B)

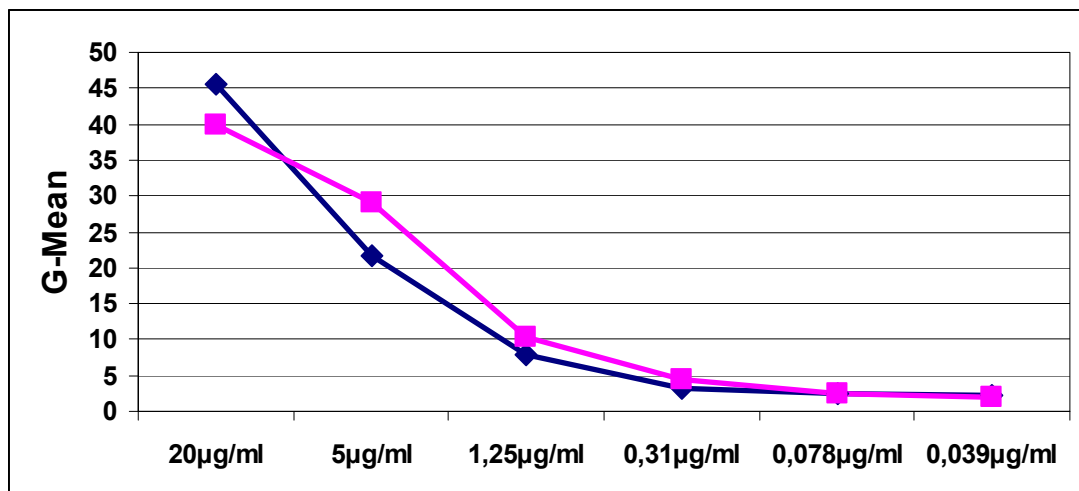


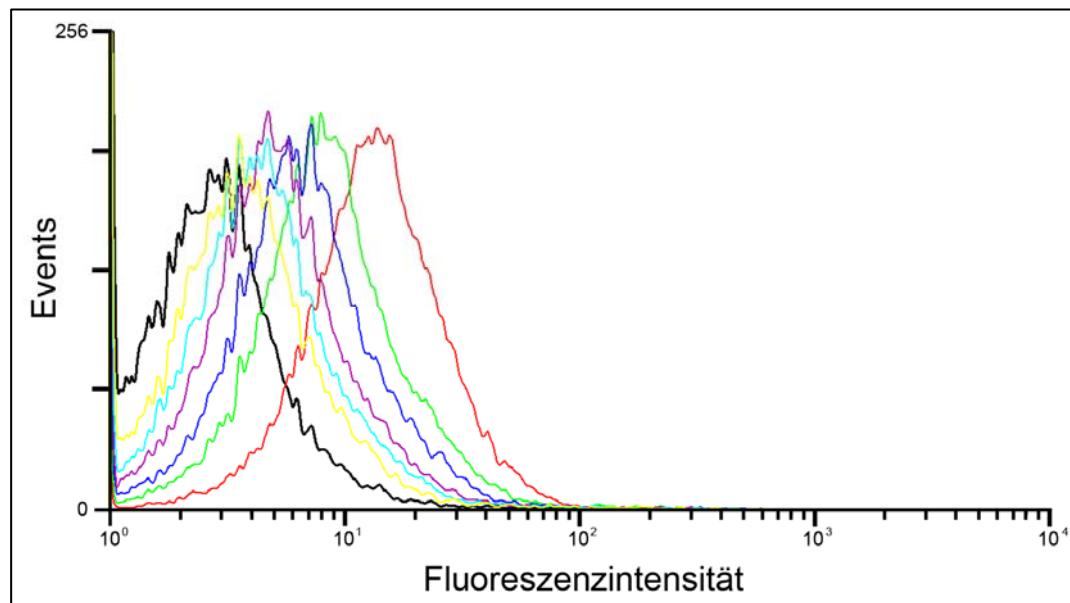
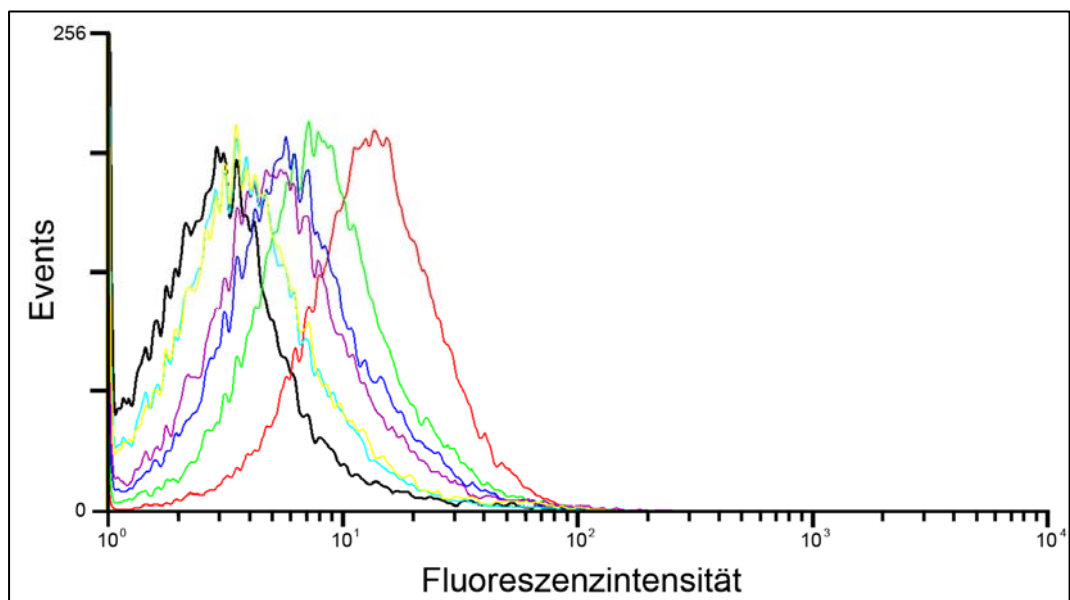
Abb. 35: Peptidtitration auf T2-Zellen; T2-Zellen wurden von exogen beladen mit **A)** SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. **B)** SSX2₄₁₋₄₉ in den Konzentrationen 20 µg/ml, 5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,31 µg/ml, 0,078 µg/ml, 0,039 µg/ml und mit den Fab-Antikörpern **A)** VIE1 (blaue Kurve), VIE1-b (rosa Kurve); **B)** Fab3 (blaue Kurve), Fab3-b (rosa Kurve) gefärbt.

Wie aus Abbildung 35 hervorgeht, bewirkt eine Färbung mit der biotinylierten Variante des jeweiligen Klon keineswegs eine Reduktion der Fluoreszenzintensität. Betrachtet man den Klon VIE1, lässt sich sogar eine Zunahme des Signals feststellen. Vergleicht man weiterhin die Werte des Klons VIE1-b mit denen des Klons Fab3-b, kann man feststellen, dass sich ähnlich hohe Werte ergeben, wobei der Klon Fab3-b ein etwas stärkeres Signal aufweist.

5.1.2. Peptidtitration auf MCF7-Zellen

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, wie sich die Fab-Antikörper VIE1-b und Fab3-b auf exogen beladenen MCF7-Zellen verhalten. Diese Zelllinie wurde

einerseits ausgewählt, weil sie weniger HLA-A*0201-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentiert, was sich anhand des geringeren Signals des anti-HLA-A*0201-Antikörpers BB7.2 erkennen lässt, und die Peptidbeladung durch kompetitive Verdrängung erfolgt. Andererseits wurde auf dieser Zelllinie schon die CTL-Inhibition nach exogener Beladung erfolgreich durchgeführt. Die Peptide wurden bis zu einer Konzentration von 1,25 µg/ml verdünnt.

A)**B)**

c)

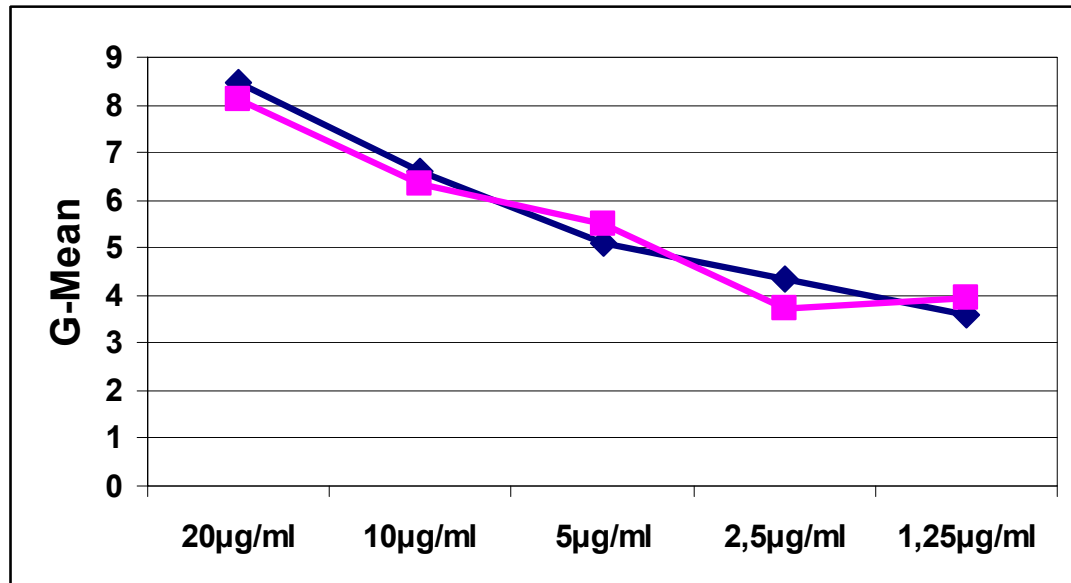


Abb. 36: Peptidtitration auf MCF7-Zellen; A) MCF7-Zellen wurden von exogen beladen mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ in den Konzentrationen 20 µg/ml (hellgrün), 10 µg/ml (blau), 5 µg/ml (violett), 2,5 µg/ml (hellblau), 1,25 µg/ml (gelb) und mit Klon VIE1-b gefärbt; **B)** MCF7-Zellen wurden von exogen beladen mit SSX2₄₁₋₄₉ in den Konzentrationen 20 µg/ml (hellgrün), 10 µg/ml (blau), 5 µg/ml (violett), 2,5 µg/ml (hellblau), 1,25 µg/ml (gelb) und mit dem Klon Fab3-b gefärbt; Negativkontrolle: unbeladene Zellen gefärbt mit VIE1-b bzw. Fab3-b und Strep.-PE (schwarz); Positivkontrolle: BB7.2 (rot); **C)** Vergleichende Darstellung der Titrationskurven der Klone VIE1-b (dunkelblau) und Fab3-b (rosa)

Bei Betrachtung von Abbildung 36C kann man erkennen, dass beide Antikörper fast identische Signale auf den exogen beladenen MCF7-Zellen aufweisen. Somit kommt man zu dem Schluss, dass die beiden Klone gegen die verschiedenen SSX2-Epitope diese gleich spezifisch und sensitiv detektieren.

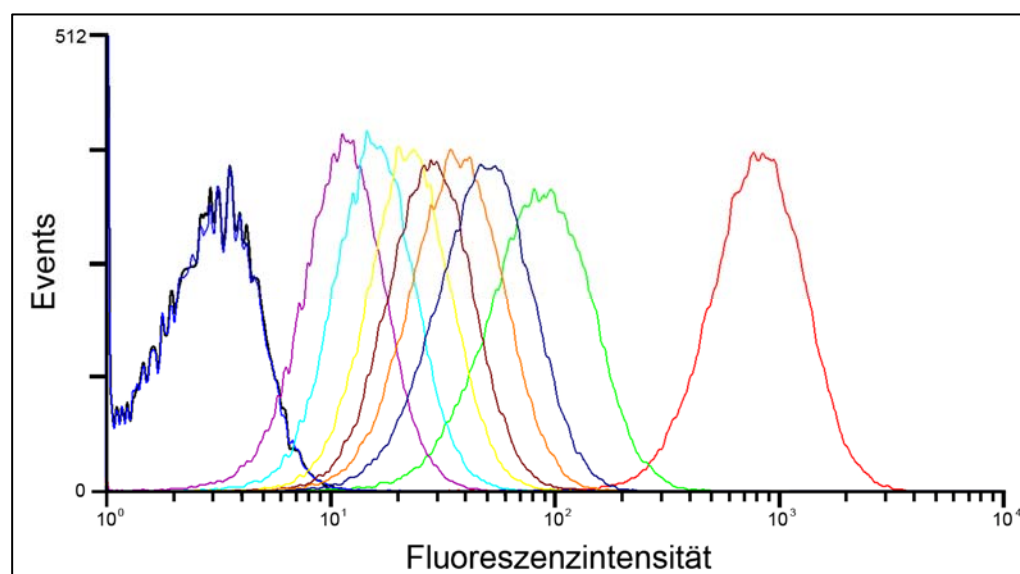
5.2. Experimentelle Bestimmung der Bindungsstärke der beiden Epitope SSX2₁₀₃₋₁₁₁ und SSX2₄₁₋₄₉ im HLA-A*0201-Kontext

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde überprüft, ob die beiden Peptide gleich effektiv und stabil an den MHC-Komplex binden. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da erst dann sichergestellt werden kann, dass beide Fab-Antikörper mit gleich hoher Sensitivität ihr Antigen detektieren. Dissoziiert beispielsweise ein Peptid schnell aus dem MHC oder bindet es sehr schlecht in seiner Peptidfurche, so wird der epitopspezifische Antikörper immer eine vergleichsweise geringere Signalhöhe bei gleicher Affinität aufweisen. Von Interesse war weiterhin, ob der mittels des SYFPEITHI-Algorithmus (Rammensee et al., 1999) theoretisch prognostizierte Bin-

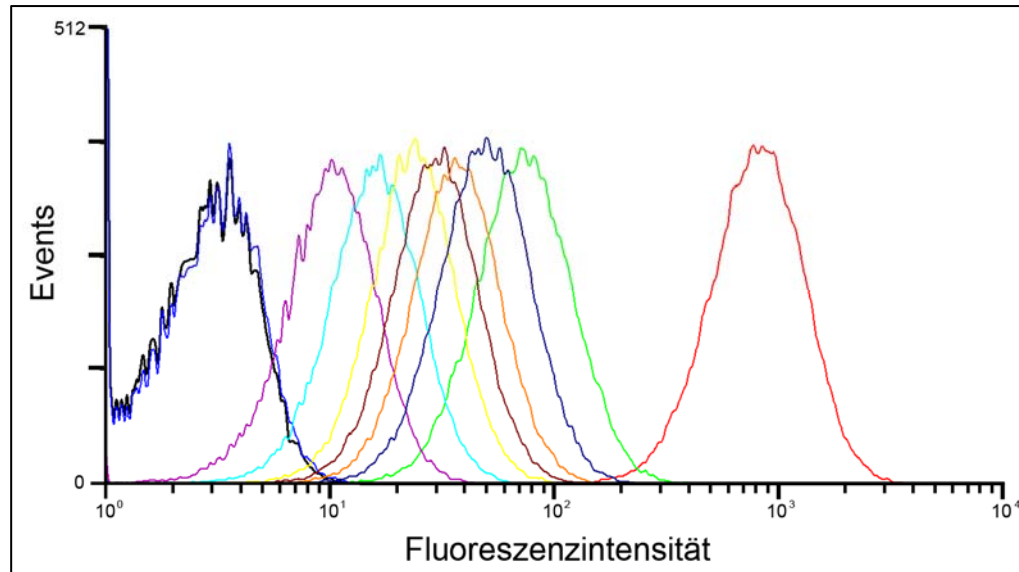
dungsscore mit dem experimentell durch Peptidverdrängung ermittelten übereinstimmte.

SYFPEITHI ist eine Datenbank für MHC-Liganden und Peptidmotive, die die Bindungsstärke eines Peptids in einem MHC-Allel vorhersagt (Rammensee et al., 1995). Ein Score-System bewertet jede Aminosäure innerhalb eines vorgegebenen Peptids. Aminosäuren, welche eher schlecht mit der entsprechenden Position des MHC-Komplexes interagieren, wurde willkürlich der Wert 1 zugewiesen, Aminosäuren, welche sehr gut mit dem MHC interagieren, ein maximaler Wert von 15. Aus Tabelle 2 im Teil Material und Methoden kann man die Bindungsstärke der Epitope SSX2₁₀₃₋₁₁₁ und SSX2₄₁₋₄₉ entnehmen. Demnach hätte das Epitop SSX2₁₀₃₋₁₁₁, mit einem Bindungsscore von 23 gegenüber dem Epitop SSX2₄₁₋₄₉, mit einem Bindungsscore von 22 eine etwas höhere Bindungsstärke. Experimentell wurde dieser prognostische Wert mit Hilfe einer Peptidverdrängung überprüft. Hierzu wurde ein Peptid mit einem sehr hohen Bindungsscore, im vorliegenden Fall CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ mit einem Bindungsscore von 30, dazu benutzt, die beiden Peptide SSX2₁₀₃₋₁₁₁ und SSX2₄₁₋₄₉ aus ihrer Bindung in der Furche des MHC-Komplexes zu verdrängen. Die Peptidverdrängung wurde in der Form durchgeführt, dass T2-Zellen exogen mit einem Gemisch aus SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉ und CMV gepulst wurden. Die Endkonzentration der beiden SSX-Epitope lag fix bei 10 µg/ml, diejenige des CMV-Peptids variierte mit einer minimalen Konzentration von 1,25 µg/ml bis zu einer maximalen Konzentration von 40 µg/ml. Im Anschluss wurde mit den MHC-Peptid-spezifischen Fab-Antikörpern (Konzentration: 50 µg/ml) gefärbt und die jeweilige Höhe der Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch detektiert.

A)



B)



C)

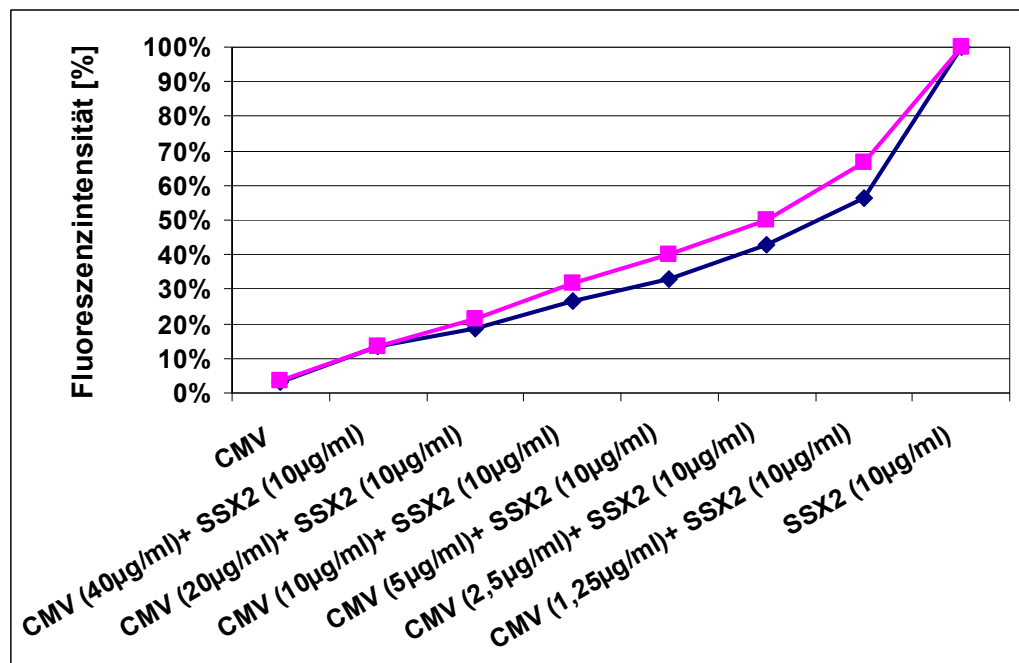


Abb. 37: Peptidverdrängung SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉ versus CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃; T2-Zellen wurden von exogen beladen mit **A)** CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ (10 µg/ml; blau), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (10 µg/ml; hellgrün), sowie einem Gemisch aus SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (10 µg/ml) und CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ in einer Endkonzentration von 40 µg/ml (violett), 20 µg/ml (hellblau), 10 µg/ml (gelb), 5 µg/ml (braun), 2,5 µg/ml (orange), 1,25 µg/ml (dunkelblau) und anschließend mit dem Klon VIE1-b gefärbt; **B)** CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ (10 µg/ml; blau), SSX2₄₁₋₄₉ (10 µg/ml; hellgrün), sowie einem Gemisch aus SSX2₄₁₋₄₉ (10 µg/ml) und CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ mit einer Endkonzentration von 40 µg/ml (violett), 20 µg/ml (hellblau), 10 µg/ml (gelb), 5 µg/ml (braun), 2,5 µg/ml (orange), 1,25 µg/ml (dunkelblau) und anschließend mit dem Klon Fab3-b gefärbt; Negativkontrolle: Sekundärantikörper (schwarz); Positivkontrolle: BB7.2 (rot); **C)** Darstellung der Fluoreszenzintensität in % des Ausgangswertes nach Beladung mit SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉ und Färbung mit VIE1-b (blaue Kurve) bzw. Fab3-b (rosa Kurve)

Aus Abbildung 37 kann man schlussfolgern, dass beide Peptid epitope ähnliche Bindungsscores aufweisen. Der Bindungsscore scheint sich jedoch genau umgekehrt als prognostiziert zu verhalten, da sich das SSX2₄₁₋₄₉-Peptid schlechter verdrängen lässt als das SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Peptid.

6. Bindungskinetik der selektionierten Antikörper

In diesem Abschnitt sind die Bindungskinetiken von je zwei verschiedenen „Nativ-“ und „in vitro-Bindern“ gegen den SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-Komplex sowie diejenige des Fab3 gegen den SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex dargestellt. Zu diesem Zweck wurden Kinetikmessungen mittels Oberflächenplasmonresonanz durchgeführt, um die Assoziation, Dissoziation sowie die Affinität der jeweiligen Fab-Antikörper zu bestimmen.

Nach Beladung des CM5-Chips mit den MHC-Peptid-Komplexen SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 sowie SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 erfolgte in einem ersten Schritt die Testung der für den jeweiligen Fab-Antikörper optimalen Konzentrationen: Dazu wurde zunächst eine mittlere Konzentration ausgewählt. Abhängig vom erzielten Signal (RU-Wert) konnten die folgenden Konzentrationsstufen höher oder niedriger gewählt werden.

Die Bindungskinetik der Fab-Antikörper wurde mit Hilfe folgender Konzentrationsstufen ermittelt, das jeweils verwendete Injektionsvolumen ist in Klammern angegeben:

- **IIIB1:** 0,5 µM; 1 µM; 2,5 µM; 5 µM; 7,5 µM; 10 µM; 12,5 µM und 15 µM (70 µl)
- **VIIIE1:** 0,25 µM; 0,5 µM; 1 µM; 2,5 µM; 5 µM; 7,5 µM; 10 µM; 12,5 µM und 15 µM (35 µl)
- **VIE1:** 0,05 µM; 0,1 µM; 0,25 µM; 0,5 µM; 0,75 µM; 1 µM, 2,5 µM und 5 µM (50 µl)
- **IIID2:** 0,05 µM; 0,1 µM; 0,25 µM; 0,5 µM; 1 µM; 2,5 µM; 5 µM; 7,5 µM und 10 µM (50 µl)
- **Fab3:** 0,01 µM; 0,05 µM; 0,1 µM; 0,25 µM; 0,5 µM; 1 µM, 2,5 µM; 5 µM und 10 µM (50 µl)

Abbildung 38 zeigt exemplarisch das sich nach Messung des Fab-Antikörpers VIE1 ergebende Sensorgramm.

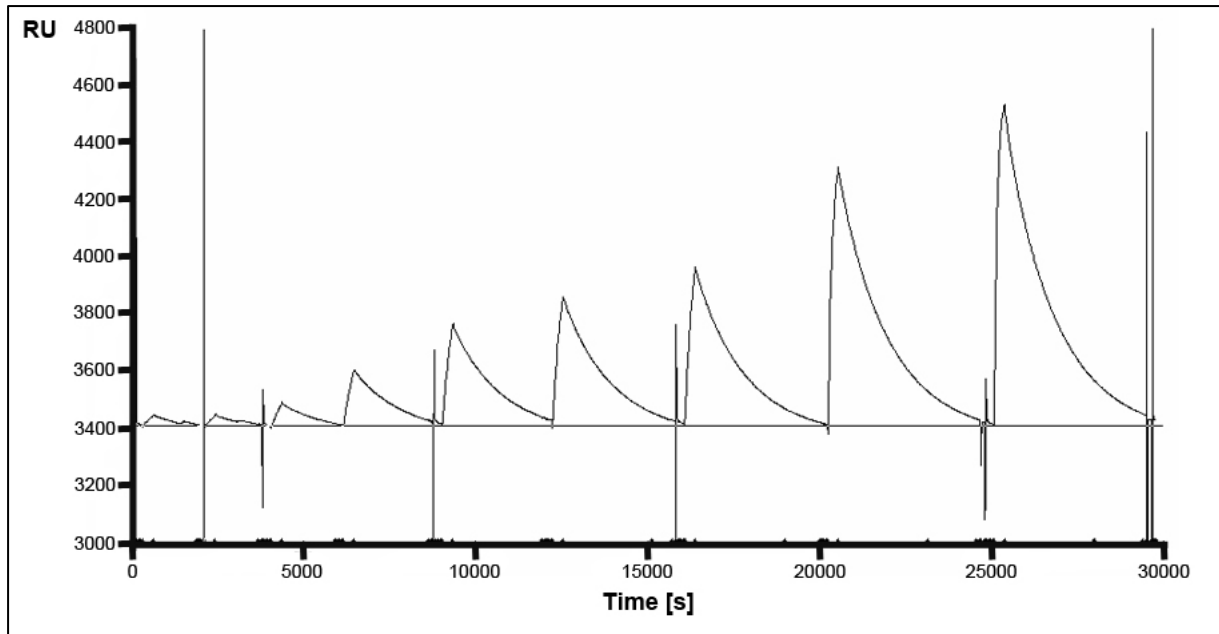
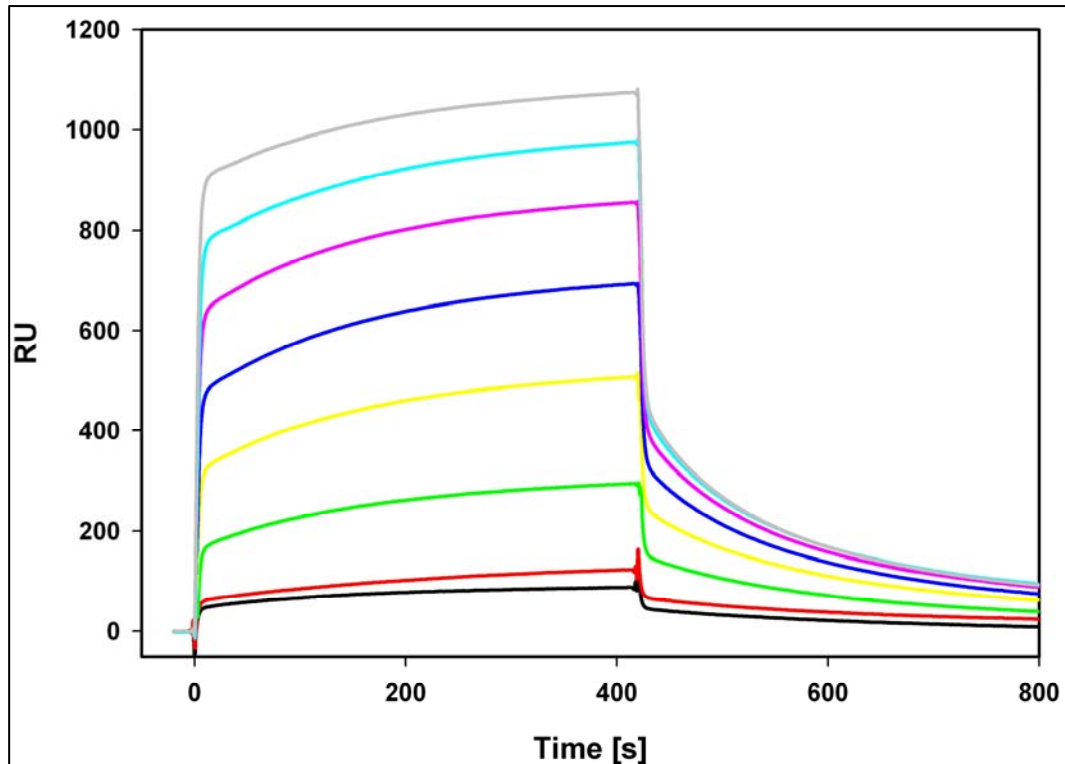
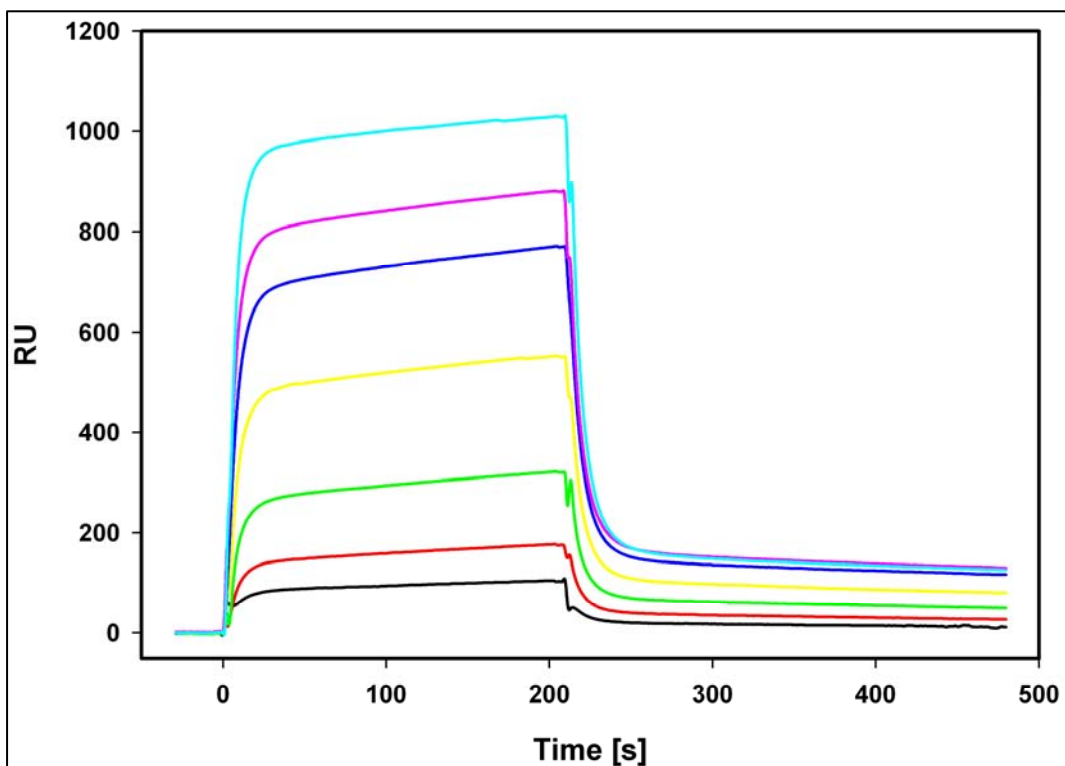


Abb. 38: Sensorgramm des Klon VIE1

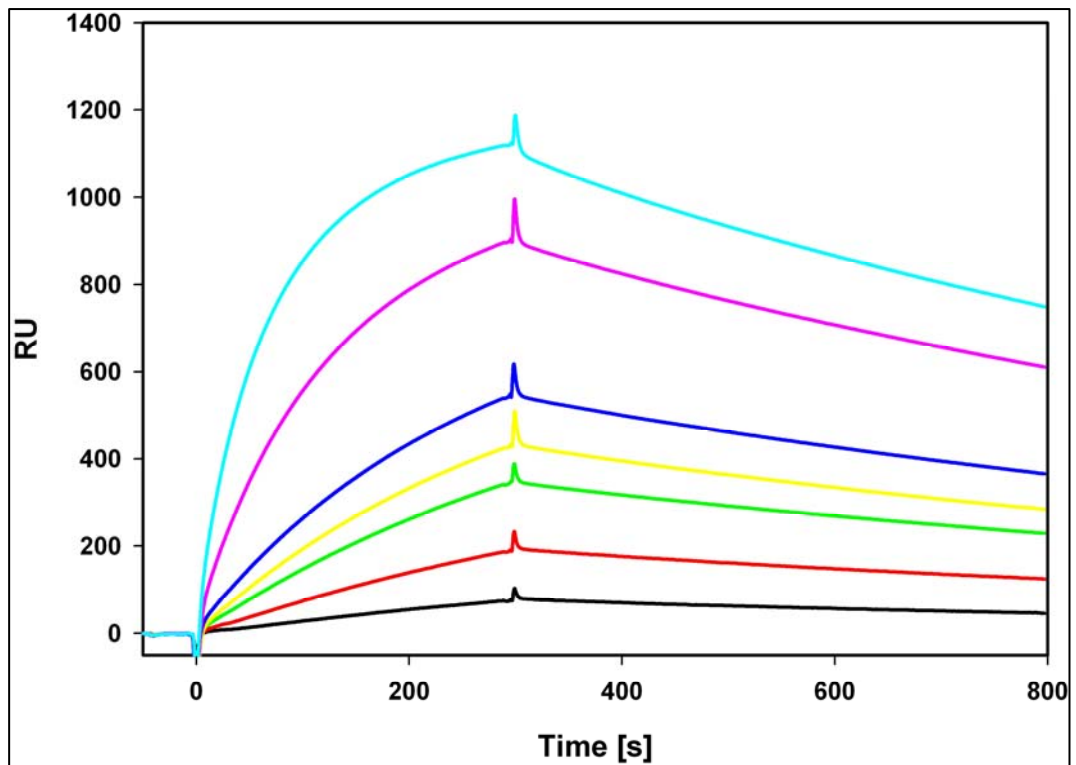
Bei den im Sensorgramm auftretenden Peaks handelt es sich um geräteabhängige Puffersprünge. Wichtig ist es, nach jeder Messung darauf zu achten, dass vor der Injektion der nächsthöheren Fab-Konzentration die Basislinie wieder erreicht wird. Die Dissoziationszeit wurde folglich bei den einzelnen Messungen so gewählt, dass wieder eine stabile Basislinie erkennbar war. Nach jeder zweiten Injektion wurde der MHC-Peptid-Komplex erneut durch Injektion von 5 μ l 1 M NaCl stabilisiert. Die Flussgeschwindigkeit lag bei allen Messungen bei 10 μ l/min, das Injektionsvolumen variierte je nach Fab-Antikörper zwischen 35 und 70 μ l. Als Negativkontrollen dienten eine Flusszelle, die nur mit Streptavidin beladen war, sowie der MHC-Peptid-Komplex, der das jeweils andere SSX2-Epitops präsentierte.

Im Anschluss erfolgte die Auswertung mittels eines Langmuir 1:1 Bindungsmodells des BIAevaluation Programms der Firma Biacore (Freiburg). Im Folgenden findet sich eine graphische Gegenüberstellung der Messergebnisse der o.g. Fab-Antikörper mit ausgewählten Konzentrationen:

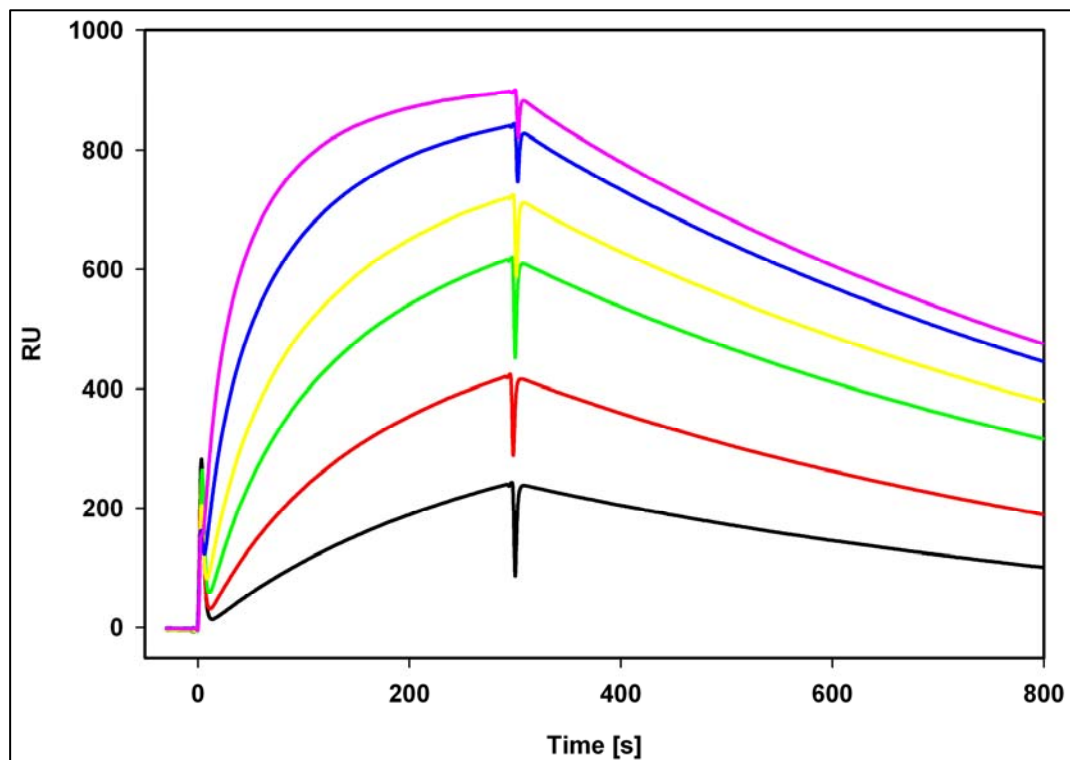
A)**B)**

Anmerkung: Bei den „in vitro-Bindern“ IIIB1 sowie VIIIE1, dargestellt in Abb. 39 **A)** und **B)**, wurden die zu Beginn der Assoziation bzw. Dissoziation fast senkrechten Kurvenanstiege bzw. -abfälle als Puffersprünge interpretiert und die Hauptphase der Assoziation bzw. Dissoziation nach diesem Puffersprung gesehen.

C)



D)



E)

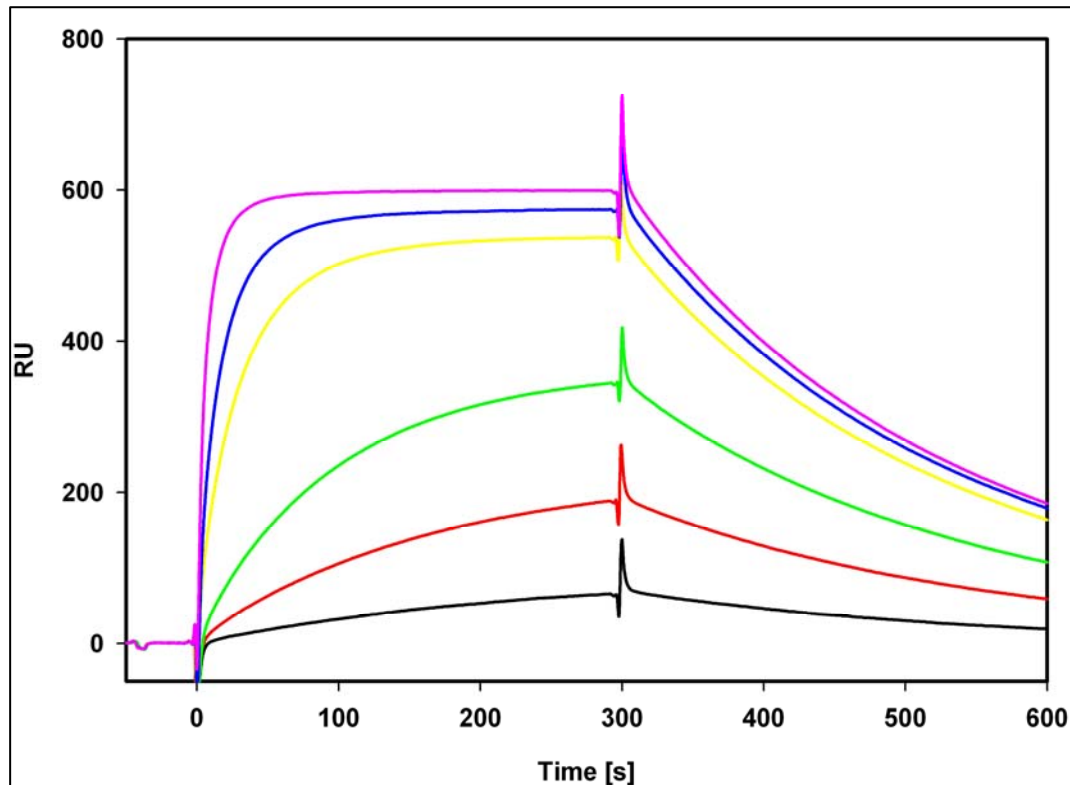


Abb. 39: Bindungskinetik der Klone A) IIIB1; B) VIIIE1; C) VIE1; D) IID2; E) Fab3; A) Klon IIIB1 in den Konzentrationen 0,5 μM (schwarz), 1 μM (rot), 2,5 μM (hellgrün), 5 μM (gelb), 7,5 μM (blau), 10 μM (rosa); 12,5 μM (hellblau), 15 μM (grau); **B)** Klon VIIIE1 in den Konzentrationen 0,5 μM (schwarz), 1 μM (rot), 2,5 μM (hellgrün), 5 μM (gelb), 7,5 μM (blau), 10 μM (rosa); 15 μM (hellblau); **C)** Klon VIE1 in den Konzentrationen 0,1 μM (schwarz), 0,25 μM (rot), 0,5 μM (hellgrün), 0,75 μM (gelb), 1 μM (blau), 2,5 μM (rosa); 5 μM (hellblau); **D)** Klon IID2 in den Konzentrationen 0,1 μM (schwarz), 0,25 μM (rot), 0,5 μM (hellgrün), 1 μM (gelb), 2,5 μM (blau), 5 μM (rosa); **E)** Klon Fab3 in den Konzentrationen 0,01 μM (schwarz), 0,05 μM (rot), 0,1 μM (hellgrün), 0,5 μM (gelb), 1 μM (blau), 2,5 μM (rosa)

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die Assoziationsrate k_a (k_{on}), die Dissoziationsrate k_d (k_{off}), die Halbwertszeit $t_{1/2}$ sowie die Dissoziationskonstante K_D (k_d/k_a), welche ein Maß für die Affinität eines Antikörpers darstellt.

Tab. 7: Bindungsparameter der Fab-Antikörper IIIB1, VIIIE1, VIE1, IID2 und Fab3

Klon	k_a [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	$*t_{1/2}$ [s]	K_D [M]
IIIB1	$3,83 \times 10^2$	$4,45 \times 10^{-3}$	155,06	$3,41 \times 10^{-5}$
VIIIE1	$3,8 \times 10^2$	$1,29 \times 10^{-3}$	534,88	$4,78 \times 10^{-6}$

Klon	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	$*t_{1/2}$ [s]	KD [M]
VIE1	$3,57 \times 10^3$	$8,39 \times 10^{-4}$	822,4	$2,25 \times 10^{-7}$
IIID2	$1,13 \times 10^4$	$1,37 \times 10^{-3}$	503,65	$2,75 \times 10^{-7}$
Fab3	$4,21 \times 10^4$	$4,04 \times 10^{-3}$	170,79	$1,44 \times 10^{-7}$

$*t_{1/2} = 0,69/k_d$

Vergleicht man die Bindungskinetik der „Nativ-Binder“ VIE1 und IIID2 mit derjenigen der „in vitro-Binder“ VIIIIE1 und IIIB1, so stellt man eine deutlich höhere Affinität der „Nativ-Binder“ fest, was sich in einer um bis zu zwei Zehnerpotenzen niedrigeren Dissoziationskonstante bemerkbar macht.

Beim Vergleich der Bindungsparameter der Klone VIE1 (Epitop SSX2₁₀₃₋₁₁₁) und Fab3 (Epitop SSX2₄₁₋₄₉) kann man erkennen, dass der Fab3 mit etwa der 10-fachen Menge an Antikörpermolekülen pro Sekunde an das Antigen bindet, was sich in einem 10-fach höheren k_a -Wert niederschlägt. Jedoch ist der k_d -Wert des Klons VIE1 niedriger als derjenige des Klons Fab3, was bedeutet, dass sich der Klon VIE1 deutlich langsamer von seinem Antigen löst. Die Folge hiervon ist, dass der Klon VIE1 mit 822,4 Sekunden eine relativ lange Halbwertszeit hat. Betrachtet man allerdings die Dissoziationskonstante KD, welche sowohl von der Assoziations- als auch von der Dissoziationsrate beeinflusst wird, zeigen beide Antikörper eine ähnliche Affinität zu ihrem Antigen.

7. Detektion des MHC-Peptid-Komplexes nach endogener Prozessierung und Präsentation

Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit bildete die Detektion des MHC-Peptid-Komplexes nach endogener Prozessierung und Präsentation. Eine derartige „Visualisierung“ der SSX2-Präsentation würde die Möglichkeit bieten, die Expression und Präsentation dieses CT-Antigens sowie dessen Hoch- und Herunterregulation auf verschiedenen Zelllinien und letztlich am Tumorgewebe näher zu untersuchen.

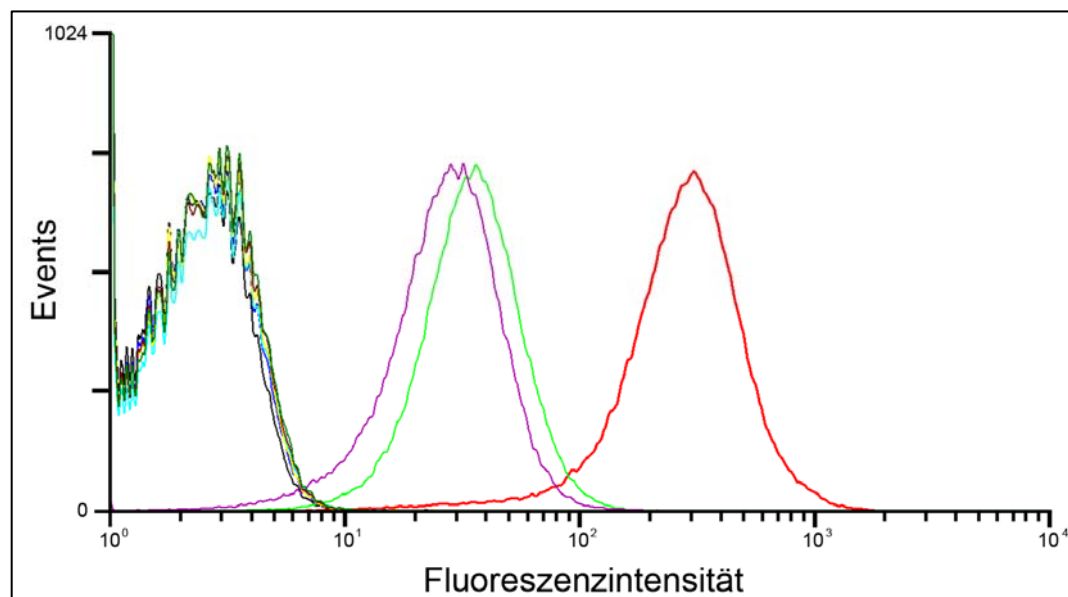
7.1. Ausschluss einer Kreuzreaktivität gegen andere Mitglieder der SSX-Familie

Es wurde schon in der Einleitung in Kapitel 7.3 darauf eingegangen, dass in einer Reihe von Tumoren und im Testisgewebe auch andere Mitglieder der SSX-Familie exprimiert werden. Aufgrund der sehr großen Homologie der SSX-Familie wurden zum Ausschluss einer Kreuzreaktivität der Fab-Antikörper, die fälschlicherweise als eine Expression und Präsentation von SSX2 interpretiert würde, T2-Zellen von exogen mit den verschiedenen Mitgliedern der SSX-Familie beladen. Es kamen folgende Peptid epitope in einer Konzentration von 20 µg/ml zum Einsatz:

- SSX1₁₀₃₋₁₁₁
- SSX2₁₀₃₋₁₁₁
- SSX3₁₀₃₋₁₁₁ (identisch mit SSX5₁₀₃₋₁₁₁ und SSX9₁₀₃₋₁₁₁)
- SSX4₁₀₃₋₁₁₁
- SSX4₁₀₃₋₁₁₁ AS (alternative Spleißvariante von SSX4)
- SSX6₁₀₃₋₁₁₁ (identisch mit SSX8₁₀₃₋₁₁₁)
- SSX7₁₀₃₋₁₁₁
- SSX1₄₁₋₄₉ (identisch mit SSX8₄₁₋₄₉)
- SSX2₄₁₋₄₉
- SSX3₄₁₋₄₉
- SSX4₄₁₋₄₉
- SSX5₄₁₋₄₉
- SSX6₄₁₋₄₉
- SSX7₄₁₋₄₉
- SSX9₄₁₋₄₉

Die Färbung der SSX-Epitope p103-111 erfolgte mit dem Klon VIE1-b, die der SSX-Epitope p41-49 mit dem Klon Fab3 jeweils in einer Konzentration von 50 µg/ml:

A)



B)

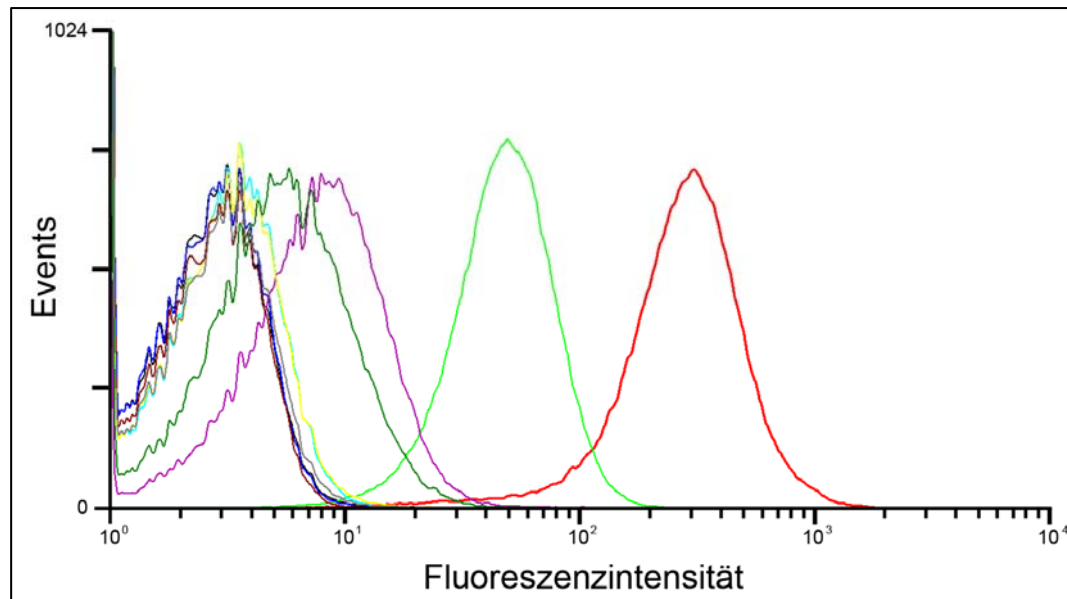


Abb. 40: Untersuchung der Kreuzreaktivität der Klone VIE1-b und Fab3-b gegenüber Mitgliedern der SSX-Familie nach exogener Beladung auf T2-Zellen; T2-Zellen wurden von exogen beladen mit **A)** SSX1₁₀₃₋₁₁₁ (blau), SSX2₁₀₃₋₁₁₁ (hellgrün), SSX3₁₀₃₋₁₁₁ (violett), SSX4₁₀₃₋₁₁₁ (hellblau), SSX4₁₀₃₋₁₁₁ AS (gelb), SSX6₁₀₃₋₁₁₁ (braun), SSX7₁₀₃₋₁₁₁ (dunkelgrün) und mit Klon VIE1-b gefärbt; **B)** SSX1₄₁₋₄₉ (blau), SSX2₄₁₋₄₉ (hellgrün), SSX3₄₁₋₄₉ (violett), SSX4₄₁₋₄₉ (hellblau), SSX5₄₁₋₄₉ (gelb), SSX6₄₁₋₄₉ (braun), SSX7₄₁₋₄₉ (dunkelgrün), SSX9₄₁₋₄₉ und mit Klon Fab3-b gefärbt; Negativkontrolle: unbeladene T2-Zellen gefärbt mit **A)** VIE1-b, **B)** Fab3-b; Positivkontrolle: Tü155 (rot)

Im Rahmen der Versuchsreihe stellte sich eine starke Kreuzreaktivität des Fab-Antikörpers VIE1-b gegenüber mit SSX3₁₀₃₋₁₁₁ beladenen Zellen heraus. Somit kann bei der Färbung mit diesem Klon nicht unterschieden werden zwischen Zellen, die das Epitop 103-111 von SSX2, SSX3, SSX5 oder SSX9 exprimieren und auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Betrachtet man die Interaktion des Fab3-b mit den Mitgliedern der SSX-Familie, so erkennt man deutlich eine Kreuzreaktivität gegenüber den Epitopen SSX3₄₁₋₄₉ und SSX7₄₁₋₄₉, die folglich bei Färbung mit dem Fab-Antikörper nicht voneinander differenziert werden können.

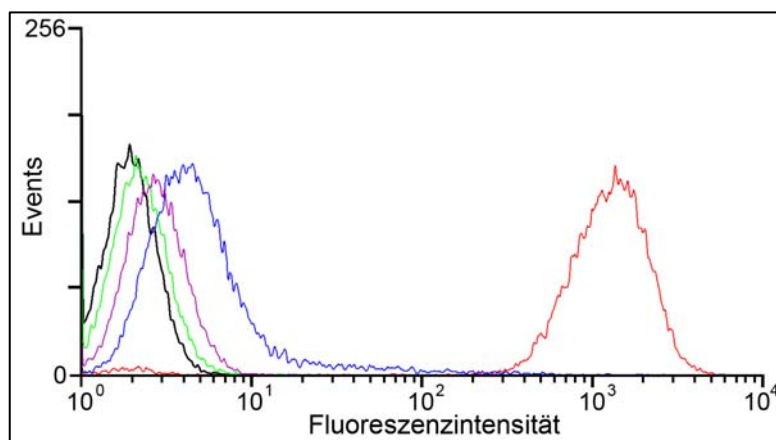
7.2. Durchflusszytometrische Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf nativen Tumorzellen

Als „Positivlinien“ dienten die zwei Tumorzelllinien Me290 und SK-Mel-37, welche sowohl SSX2 als auch HLA-A*0201 exprimieren. Als „Negativlinien“ fanden solche Tumorzelllinien Verwendung, die entweder HLA-A*0201-negativ waren oder SSX2-

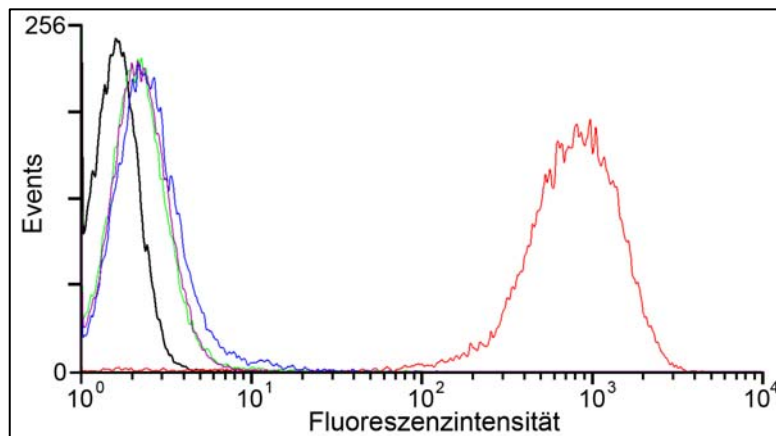
negativ waren: T47D (HLA-A*0201-negativ, SSX2-positiv), Me260 (HLA-A*0201-negativ, SSX2-positiv) und BT549 (HLA-A*0201-positiv, SSX2-negativ).

Mit den fünf Tumorzelllinien erfolgten durchflusszytometrische Analysen mit den unbiotinylierten Fab-Antikörpern VIE1, IID2 und Fab3. Als Positivkontrolle auf den HLA-A*0201-positiven Tumorzelllinien wurde der anti-HLA-A*0201-spezifische Antikörper BB7.2 verwendet, auf den HLA-A*0201-negativen Tumorzelllinien der anti-Human HLA-ABC Klasse I Antikörper W6/32. Die Abbildungen 41 A) bzw. B) zeigen die Ergebnisse der Färbungen auf den „Positivlinien“ Me290 bzw. SK-Mel-37, die Abbildungen 41 C), D) bzw. E) die Ergebnisse auf den „Negativlinien“ T47D, Me260 bzw. BT540.

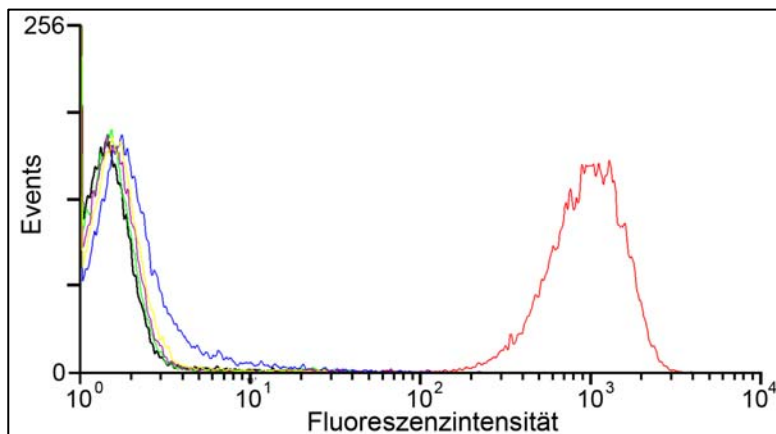
A)



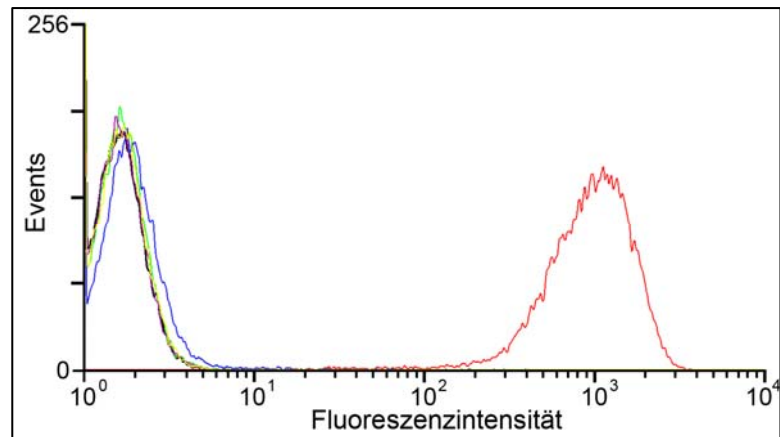
B)



C)



D)



E)

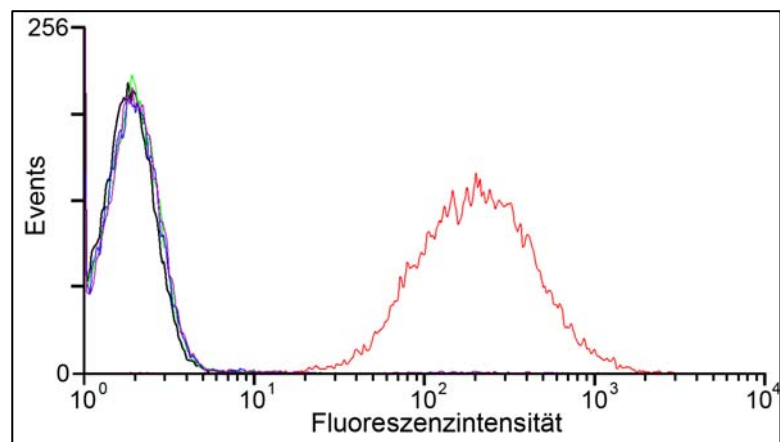


Abb. 41: Durchflusszytometrie der Klone VIE1, IIID2 und Fab3 auf nativen Tumorzellen; **A)** Me290 gefärbt mit VIE1 (hellgrün), IIID2 (violett), Fab3 (blau); Positivkontrolle: BB7.2 (rot); **B)** SK-Mel-37 gefärbt mit VIE1 (hellgrün), IIID2 (violett), Fab3 (blau); Positivkontrolle: BB7.2 (rot); **C)** T47D gefärbt mit VIE1 (hellgrün), IIID2 (violett), Fab3 (blau), BB7.2 (gelb); Positivkontrolle: w6/32 (rot); **D)** Me260 gefärbt mit VIE1 (hellgrün), IIID2 (violett), Fab3 (blau); BB7.2 (gelb); Positivkontrolle: w6/32 (rot); **E)** BT549 gefärbt mit VIE1 (hellgrün), IIID2 (violett), Fab3 (blau); Positivkontrolle: BB7.2 (rot); Negativkontrolle: Sekundäre Färbereagenzien

Die durchflusszytometrischen Analysen auf nativen Tumorzellen ergeben für die Fab-Antikörper folgendes Bild: Auf der „Positivlinie“ Me290 zeigt sich eine deutliche FI-Änderung mit den Klonen Fab3 und IIID2 sowie eine leichte FI-Änderung mit Klon FabVIE1. Nach Färbung der „Positivlinie“ SK-Mel-37 kann man mit allen drei Klonen etwa die gleiche FI-Änderung erzielen. Betrachtet man die Reaktivität der Fab-Antikörper auf den drei „Negativlinien“, so stellt man fest, dass der Fab3 höhere Hintergrundwerte liefert und folglich eine unspezifischere Bindung aufweist, als die beiden Fab-Antikörper gegen SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201.

Die dargestellten Versuche wurden mehrfach durchgeführt und lieferten auf den „Positivlinien“ nicht immer eine Änderung der FI. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen wäre die Variation der Präsentation vieler TAA auf der Zelloberfläche.

Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass native Tumorzelllinien auf ihrer Oberfläche nur wenige Kopien eines individuellen Peptids im HLA-A*0201-Kontext präsentieren (z.B. NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ <25-50 Moleküle pro Zelle (Purbhoo et al., 2006)). Folglich liegt die MHC Klasse I restringierte Präsentation der Epitope vieler TAA unterhalb der Nachweisgrenze eines Durchflusszytometers, dessen maximale Sensitivität laut Angaben des Herstellers bei etwa 100 PE-Molekülen pro Zelle liegt. Die in Abbildung 41 dargestellte marginale FI-Änderung kann also durch eine geringe Dichte des Antigens auf der Zelloberfläche bedingt sein, aber auch durch eine unspezifische Adhärenz des Antikörpermoleküls auf der Zellmembran. Bei kritischer Betrachtung der Ergebnisse liegt insbesondere bei Fab3 der Verdacht nahe, dass die im Verhältnis hohen FI-Änderungen auf den „Positivlinien“ unter Berücksichtigung der höheren Hintergrundwerte auf den „Negativlinien“ eher infolge einer unspezifischen Adhärenz zustande kamen.

Als Konsequenz hieraus ergab sich die Notwendigkeit einer weiteren Validierung der auf Tumorzellen erzielten Ergebnisse.

7.3. Durchflusszytometrische Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf Tumorzellen nach Behandlung mit IFN γ

Das Proteasomensystem spielt eine zentrale Rolle bei der Generierung von Epitopen, welche im Kontext eines MHC Klasse I-Komplexes präsentiert werden. Eine Stimulation von Zellen mit dem Glykoprotein IFN γ bewirkt hierbei die Bildung von sog. Immunoproteasomen (Boes et al., 1994), die im Vergleich zu den konstitutiven Proteasomen eine verbesserte Generierung vieler MHC Klasse I-Epitope aufweisen. Durch eine Behandlung der Tumorzellen sollte einerseits überprüft werden, ob es im speziellen Fall von SSX2 zu einer vermehrten Präsentation des Epitops SSX2₁₀₃₋₁₁₁ auf der Zelloberfläche kommt und andererseits ein erster Hinweis erbracht werden, dass der Fab-Antikörper VIE1-b zu einer spezifischen Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf den „Positivlinien“ in der Lage ist.

Zu diesem Zweck wurden native sowie IFN γ -behandelten Tumorzelllinien mit dem Fab-Antikörper VIE1-b gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Eine unspezifi-

sche Interaktion sollte durch eine direkte Färbung mit der biotinylierten Variante des Fab-Antikörpers VIE1-b soweit als möglich ausgeschlossen werden. Die Behandlung der Zellen mit 250 U/ml IFN γ erfolgte für 48 Stunden. Parallel hierzu wurden Zellen der gleichen Passage unbehandelt kultiviert.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Detektion sind in Abbildung 42 dargestellt:

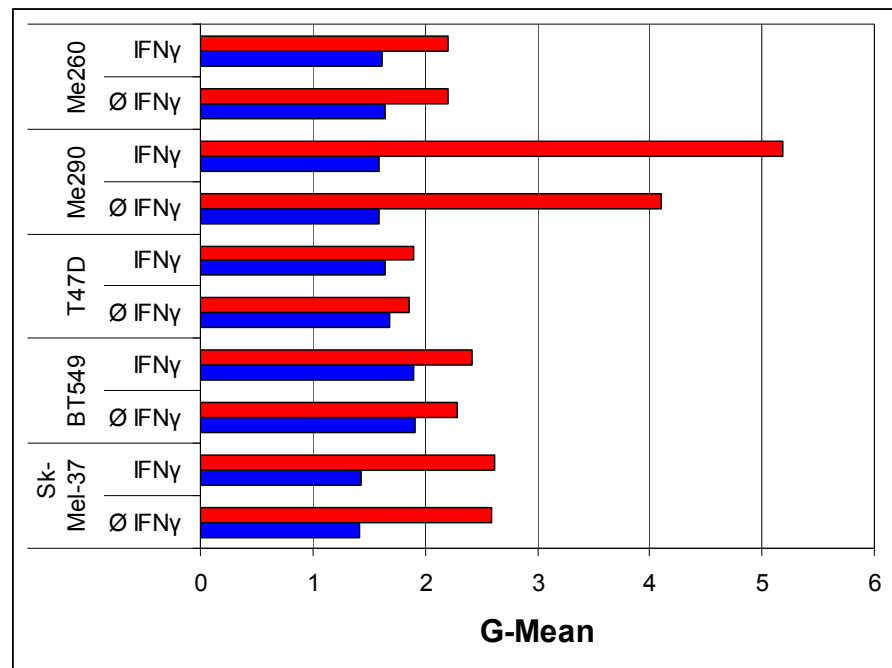


Abb. 42: Durchflusszytometrie des Klon FabVIE1-b auf nativen und IFN γ -behandelten Tumorzellen; Färbung der Tumorzelllinien SK-Mel-37, BT549, T47D, Me290 und Me260 unbehandelt (Ø IFN γ) sowie nach IFN γ -Behandlung mit FabVIE1-b (roter Balken); Negativkontrolle: blauer Balken

Aus Abbildung 42 geht hervor, dass sich die Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle und des Klon FabVIE1-b auf den „Negativlinien“ nur geringgradig unterscheidet. Weiterhin lässt sich bei den „Negativlinien“ kein Unterschied zwischen den unbehandelten Zellen und den IFN γ behandelten Zellen feststellen. Im Gegensatz hierzu liegt bei den „Positivlinien“ eine deutliche, wenn auch geringe Änderung der FI vor, die auf der Tumorzelllinie Me290 ausgeprägter ist. Einzig die Behandlung der Tumorzelllinie Me290 mit IFN γ scheint eine Zunahme der SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Präsentation zu bewirken.

7.4. Inhibitionsversuch auf den „Positivlinien“

Zum endgültigen Ausschluss einer unspezifischen Adhärenz des Fab-Antikörpers VIE1 wurde ein Inhibitionsversuch auf den „Positivlinien“ Me290 und SK-Mel-37 durchgeführt.

Sollte die FI-Änderung durch eine spezifische Antikörper/Antigen-Interaktion bedingt sein, dürfte ein biotinylierter („heißer“) Antikörper nach Vorinkubation mit einem unbiotinylierten („kalten“) Antikörper, der gegen das gleiche Antigen gerichtet ist, nicht mehr dazu in der Lage sein zu binden. Dies hätte zur Folge, dass sich bei dem Versuch einer Färbung des „heißen“ Antikörpers kein Signal mehr detektieren ließe. Haftet der Antikörper hingegen unspezifisch an der Zelloberfläche, so kann mit den üblicherweise eingesetzten Konzentrationen keine oder nur eine unzureichende Blockade erzielt werden.

Mit der Absicht, eine derartige Blockade hervorzurufen, wurden die „Positivlinien“ einerseits mit den SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-spezifischen, unbiotinylierten „kalten“ Fab-Antikörpern VIE1 und IIID2 sowie andererseits mit dem SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-spezifischen Fab3 und einem Kontroll-Fab-Antikörper gegen NY-ESO₁₅₇₋₁₆₅ / HLA-A*0201 (3M4E5), in einer 7,5-fach höheren Konzentration vorinkubiert. Diese Inkubation hatte zum Ziel, den SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 für den dann folgenden, biotinylierten „heißen“ Fab-Antikörper, VIE1-b zu blockieren, so dass nach dessen Zugabe keine FI-Änderung in der Durchflusszytometrie mehr erfolgen kann. Um zu gewährleisten, dass der nachträglich zugesetzte Fab-Antikörper den zuvor gebundenen „kalten“ Fab-Antikörper nicht verdrängt, wurde nach der Zugabe des blockierenden Fab-Antikörpers nicht gewaschen.

Zum Nachweis, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen grundsätzlich eine Inhibition erreicht werden kann, wurde parallel zur Durchführung auf Tumorzelllinien ein Inhibitionsversuch auf von extern mit Peptiden beladenen T2-Zellen durchgeführt. Im Rahmen dieses Experimentes wurden T2-Zellen mit einer Peptidkonzentration von 1,25 µg/ml beladen, so dass sich ein etwas höheres Signal nach Färbung mit dem Fab-Antikörper VIE1-b ergab als auf Tumorzellen. Der „kalte“ Fab-Antikörper wurde in einer Konzentration von 150 µg/ml eingesetzt und der „heiße“ Fab-Antikörper in einer Endkonzentration von 20 µg/ml.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie auf exogen beladenen T2-Zellen sowie auf den Tumorzelllinien Me290 und SK-Mel-37 dargestellt. Abbil-

dung 43 zeigt, dass es auf T2-Zellen zu einer effizienten, nahezu 100%igen Blockwirkung durch die beiden unbiotinylierten Fab-Antikörper IID2 und VIE1 kommt. Im Gegensatz hierzu sind die Klone Fab3 sowie 3M4E5 nicht in der Lage die Bindung des biotinylierten FabVIE1-b zu verhindern. Folglich sollte bei spezifischer Bindung des Klons FabVIE1-b unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Blockwirkung auf den Tumorzelllinien prinzipiell erkennbar sein.

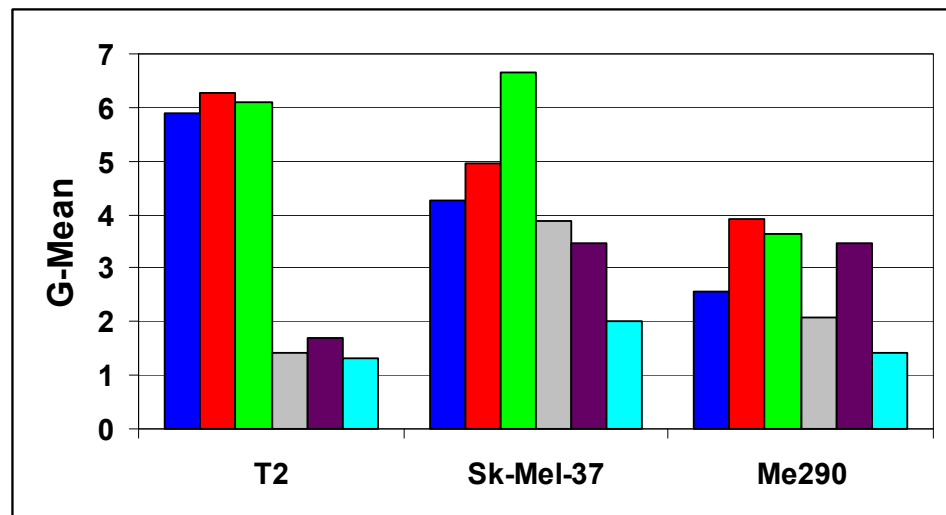


Abb. 43: Blockversuch auf exogen beladenen T2-Zellen sowie auf den „Positivlinien“ SK-Mel-37 und Me290; Die Zellen wurden gefärbt mit FabVIE1-b ohne blockierenden Fab-Antikörper (blau) sowie nach Blockade mit Fab3 (rot), 3M4E5 (hellgrün), FabVIE1 (grau) und IID2 (lila); Negativkontrolle: sekundäre Färbereagenzien (türkis)

Aus den in Abbildung 43 dargestellten Ergebnissen lässt sich unschwer erkennen, dass im Vergleich zu den Ergebnissen auf T2-Zellen auf den Tumorzelllinien SK-Mel-37 und Me290 keine signifikante Blockwirkung erzielt wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass der Fab-Antikörper VIE1-b auf beiden „Positivlinien“ zu einer Struktur kreuzreaktiv ist, distinkt von der des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201. Abschließend kann man sagen, dass keine valide durchflusszytometrische Detektion auf nativen Tumorzellen möglich ist, die SSX2 prozessieren und seine Epitope im HLA-A*0201-Kontext präsentieren.

7.5. Fluoreszenzmikroskopische Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf nativen Tumorzellen

In den vorhergehenden Kapiteln wurde bereits darauf eingegangen, dass die Durchflusszytometrie als Detektionsmethode ungeeignet ist: Sie ist nicht sensitiv genug,

um die geringe Anzahl eines speziellen MHC-Peptid-Komplexes auf der Zelloberfläche detektieren zu können. Somit kam der Wunsch auf, die Bindung des epitopspezifischen Antikörpers an seinen jeweiligen MHC-Peptid-Komplex direkt zu visualisieren.

Es ist bekannt, dass HLA Klasse I-Moleküle häufig in Clustern auf der Zelloberfläche vorkommen (Matko et al., 1994) und dass sich derartige Cluster fluoreszenzmikroskopisch darstellen lassen (Fooksman et al., 2006). Dieser Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich damit, die beiden Epitope SSX2₁₀₃₋₁₁₁ und SSX2₄₁₋₄₉ im Kontext von HLA-A*0201 fluoreszenzmikroskopisch zu detektieren sowie mit der SSX2-Protein-Expression zu korrelieren, um eine Aussage über die Effizienz der Prozessierung treffen zu können.

In einem ersten Schritt wurden hierzu SSX2-positive sowie -negative Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem epitopspezifischen Fab-Antikörper einer Oberflächenfärbung unterzogen. Die SSX2-Expression wurde zum Zeitpunkt der Färbung mit Hilfe einer RT-PCR untersucht. Weiterhin wurde das in den Zellen vorliegende SSX-Protein unter Verwendung des murinen monoklonalen Antikörpers E3AS mit einer intrazellulären Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Der verwendete Antikörper erkennt spezifisch die Proteine SSX2, SSX3 und SSX4 der SSX-Familie (dos Santos et al., 2000). Im Fall einer spezifischen Detektion des MHC-Peptid-Komplexes sollte in einem zweiten Schritt die Frage beantwortet werden, ob die betrachtete singuläre Zelle beide Epitope gleichzeitig präsentiert oder jeweils nur ein Epitop. In einem letzten Schritt wurde die Präsentation HLA-A*0201-restringierter Epitope auf der Zelloberfläche nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin untersucht.

Alle Bilder wurden mittels einer EM-CCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device; iXon DV887, Andor; Belfast, Nordirland) Kamera aufgezeichnet. Da EM-CCDs nur dazu in der Lage sind, die Intensität des einfallenden Lichtes wiederzugeben und nicht dessen Wellenlänge, entsteht beim Bildaufbau durch den Computer ein Schwarz-Weiß-Bild. Die Auswertung erfolgte durch das Programm ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, Maryland, USA). Hierbei wurden die Intensitätsverteilungen im Objekt in einem Color-Lookup-Table dargestellt, d. h. die Detektion des Farbstoffes PE wurde durch die Farbe rot, die des Farbstoffes FITC durch die Farbe grün kodiert.

7.5.1. Untersuchung der SSX-Expression und Präsentation HLA-A*0201 restringierter Epitope

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde die RNA aus jeweils 2×10^6 Zellen isoliert, mit Hilfe der genspezifischen Primer SSX1-9 amplifiziert und auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromid visualisiert. Die Tumorzellen wurden zuvor am Tag einer jeden Oberflächenfärbung in Stickstoff bis zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion eingefroren. Als Positivkontrolle diente die aus Testisgewebe isolierte mRNA. Dargestellt sind im Folgenden die Ergebnisse der SSX-Expression der für die Oberflächenfärbung verwendeten Zelllinien:

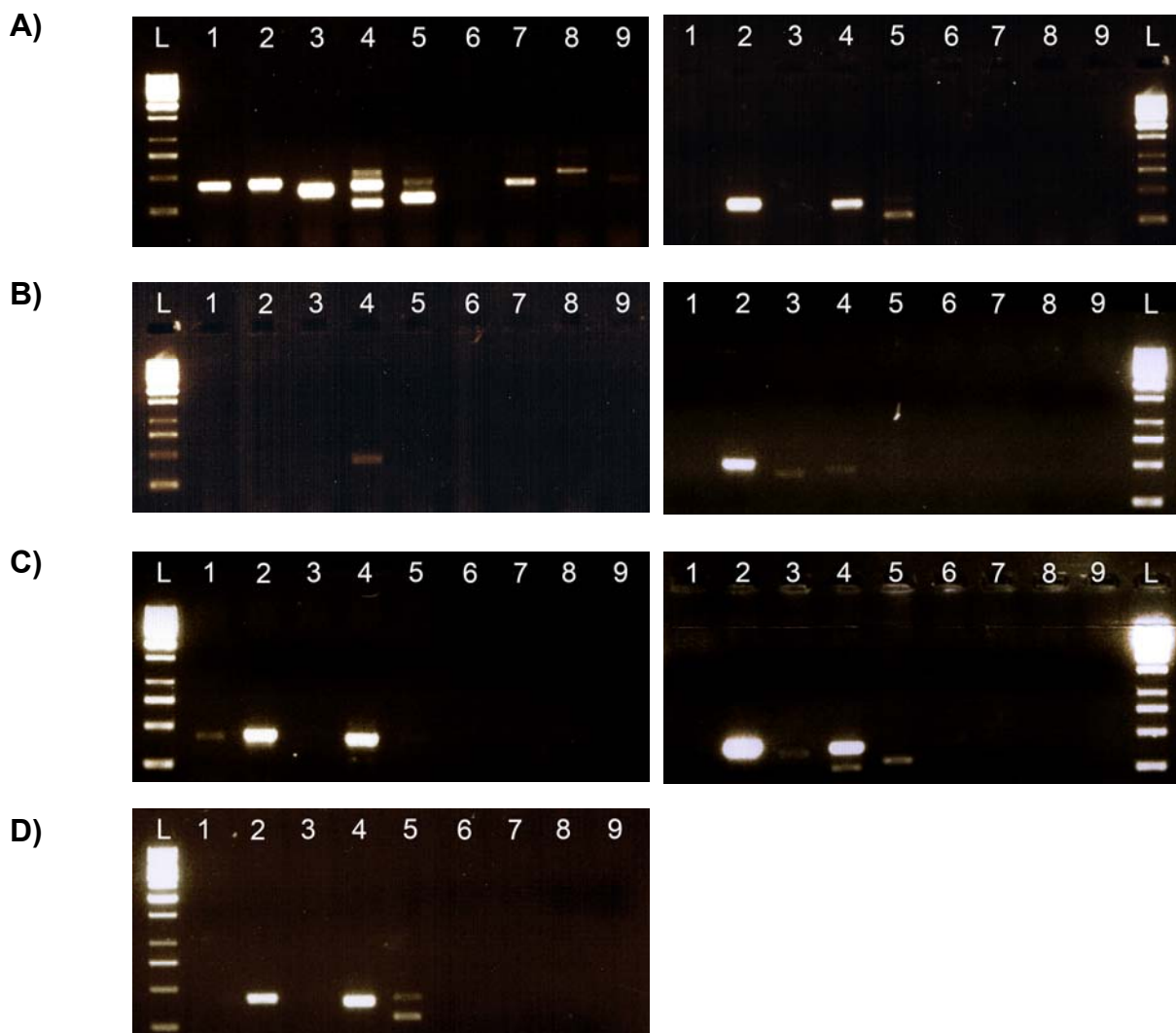


Abb. 44: Analyse der SSX-Expression verschiedener Tumorzelllinien mittels RT-PCR; Positivkontrolle: Testisgewebe (links); Me260 (rechts); **B)** MCF7 (links); Me290 (rechts); **C)** SK-Mel-37 (links); Me275 (rechts); **D)** T47D; Längenmarker Gene Ruler 1kb Ladder (L); SSX1-SSX9 (1-9)

Tabelle 8 fasst die SSX-Expression der Tumorzelllinien sowie des Testisgewebes zusammen.

Tab. 8: SSX-Expression in Tumorzelllinien und Testisgewebe

Linie	SSX1	SSX2	SSX3	SSX4	SSX5	SSX6	SSX7	SSX8	SSX9
Testis	++	++	++	++	++	-	++	+	-
Me260	-	++	-	++	+	-	-	-	-
MCF7	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
Me290	-	++	(+)	(+)	-	-	-	-	-
SK-Mel-37	(+)	++	-	++	-	-	-	-	-
Me275	-	++	(+)	++	+	-	-	-	-
T47D	-	++	-	++	+	-	-	-	-

Bei allen in den nachfolgenden Abbildungen dargestellten Oberflächenfärbungen wurde als Positivkontrolle der HLA-A*0201-spezifische Antikörper BB7.2 verwendet. Als Negativkontrolle diente die Färbung mit einem aus der Ziege gewonnenen, biotinylierten anti-Maus-Ig-Fab und Streptavidin-PE. Die Fab-Antikörper VIE1-b sowie Fab3-b wurden in der Konzentration 50 µg/ml eingesetzt. Zum Nachweis, dass sich bei den „Negativlinien“ (HLA-A*0201⁻ oder SSX2⁻), Negativkontrollen und nicht angefärbten Zellen am Ort der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme eine ausreichende Anzahl an Zellen befand, wurde zusätzlich ein durchlichtmikroskopisches Bild dargestellt. Durch unspezifische Aggregation von Farbstoffen entstandene Artefakte sind in den Abbildungen jeweils durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Bei den Aufnahmen mit Fab3-b und FabVIE1-b wurde im Vergleich zur Positivkontrolle eine deutlich höhere Lichtverstärkung verwendet. Die „Negativkontrollen“ wurden bei gleich hoher oder höherer Verstärkung detektiert.

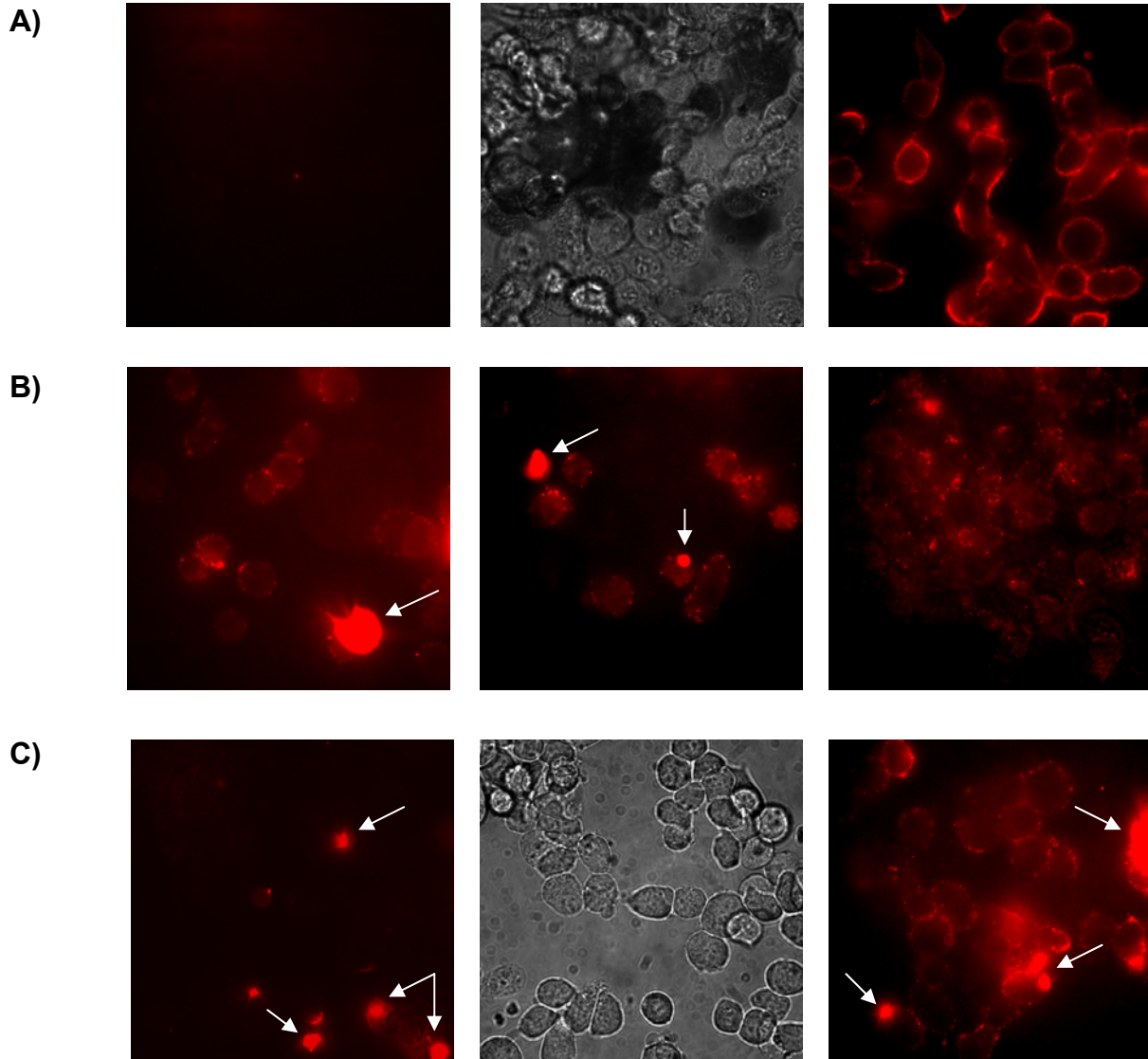
Ergebnisse der Membranfärbung auf der Zelllinie Me275:

Abb. 45: Oberflächenfärbung der Tumorzelllinie Me275 (Vergrößerung: 40x); A) Visualisierung der HLA-A*0201 Schwerkette: sekundäre Färbereagenzien als Negativkontrolle (links); Durchlichtaufnahme der Negativkontrolle (Mitte); anti-HLA-A*0201 IgG BB7.2 (rechts) **B)** Visualisierung des SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 Komplexes: 3 repräsentative Bilder der Färbung mit Fab3-b; **C)** Visualisierung des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahme der Färbung mit FabVIE1-b (links); Durchlichtaufnahme der repräsentativen Aufnahme (Mitte); in jedem 10.-20. Gesichtsfeld fand sich eine Membranfärbung mit FabVIE1-b (rechts); weiße Pfeile: durch unspezifische Aggregation von Farbstoffen entstandene Artefakte

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei der Färbung mit den Fab-Antikörpern nur einzelne Cluster von MHC-Peptid-Komplexen zur Darstellung kamen, während nahezu auf der kompletten Membran HLA-A*0201 detektierbar war. Des

Weiteren präsentierten wesentlich mehr Zellen der Linie Me275 den SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex als den SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-Komplex.

Ergebnisse der Membranfärbung auf der Zelllinie SK-Mel-37:

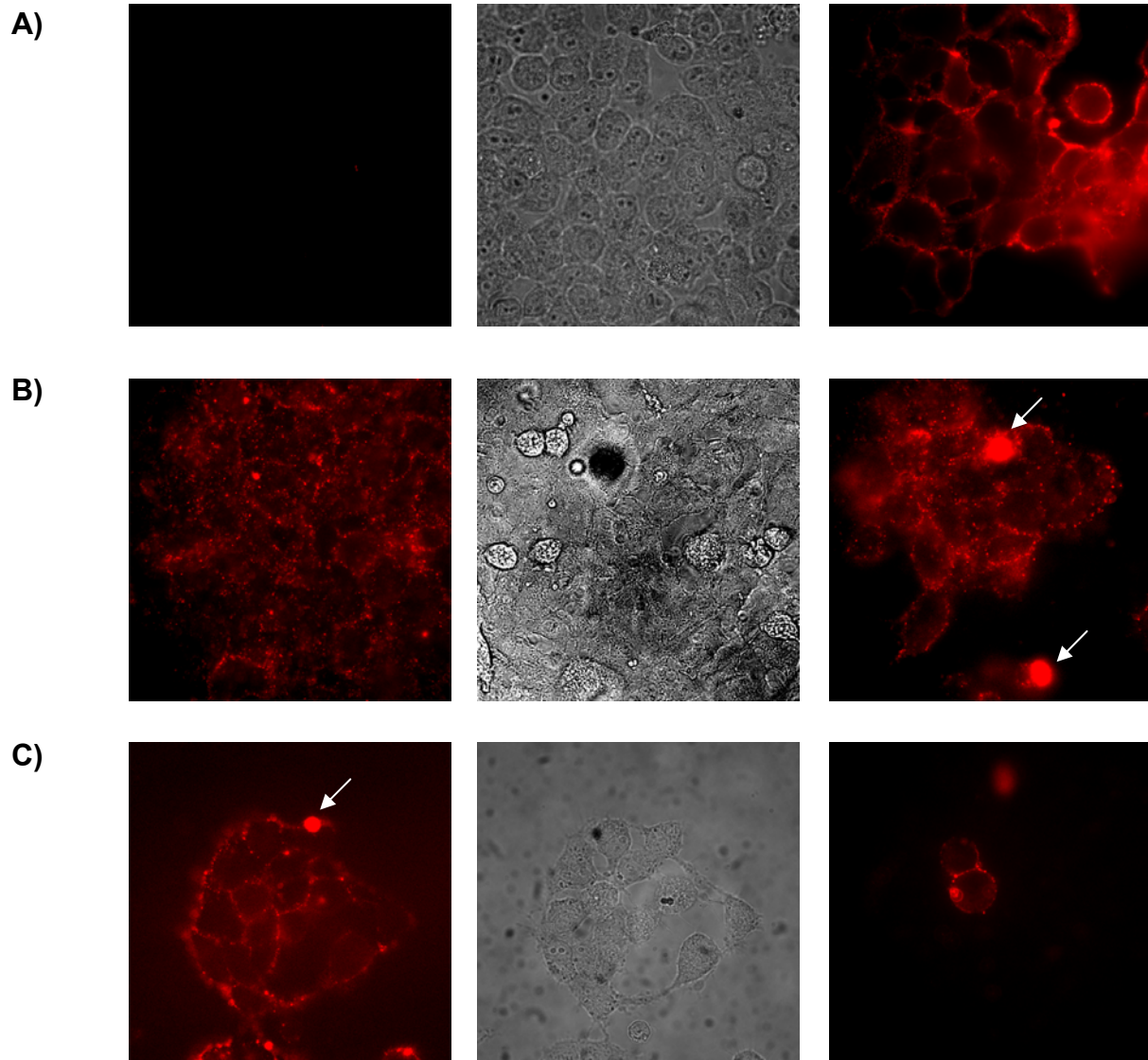


Abb. 46: Oberflächenfärbung der Tumorzelllinie SK-Mel-37 (Vergrößerung: 40x); A) Visualisierung der HLA-A*0201 Schwereketten: sekundäre Färbereagenzien als Negativkontrolle (links); Durchlichtaufnahme der Negativkontrolle (Mitte); anti-HLA-A*0201 IgG BB7.2 (rechts) **B)** Visualisierung des SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit Fab3-b (links und rechts); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (Mitte); **C)** Visualisierung des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit FabVIE1-b (links und rechts); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (Mitte); weiße Pfeile: durch unspezifische Aggregation von Farbstoffen entstandene Artefakte

Betrachtet man die Fluoreszenzbilder auf der Tumorzelllinie SK-Mel-37, so sind mit beiden Fab-Antikörpern fast alle Zellen angefärbt. Allerdings war die Membranfärbung mit Fab3-b etwas intensiver, und es fanden sich fast keine Zellen ohne Oberflächenfärbung.

Ergebnisse der Membranfärbung auf der Zelllinie Me290

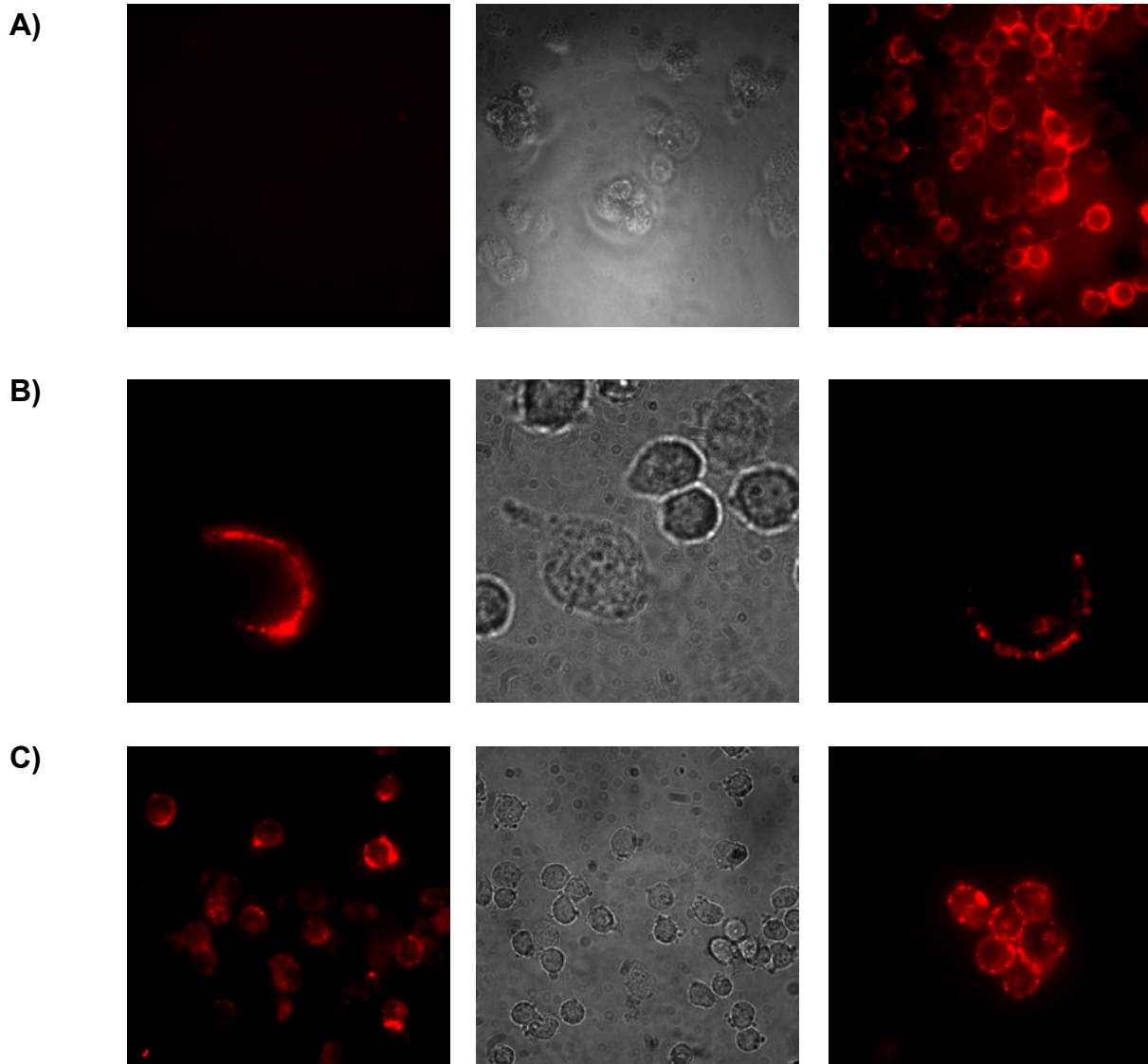


Abb. 47: Oberflächenfärbung der Tumorzelllinie Me290 (Vergrößerung: 40x bzw. 100x); **A)** Visualisierung der HLA-A*0201 Schwereketten: sekundäre Färbereagenzien als Negativkontrolle (links); Durchlichtaufnahme der Negativkontrolle (Mitte); anti-HLA-A*0201 IgG BB7.2 (rechts) **B)** Visualisierung des SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit Fab3-b (links und rechts); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (Mitte); **C)** Visualisierung des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit FabVIE1-b (links und rechts); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (Mitte).

Wie man den Bildern in Abbildung 47 entnehmen kann, ließ sich der SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-Komplex nur auf wenigen Zellen der Linie Me290 detektieren. Bei einer Färbung mit Fab3-b waren etwa 0,1-1% der Zellen angefärbt. Die Präsentation des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 war in etwa vergleichbar. Die Detektion mit FabVIE1-b zeigte geringfügig mehr spezifisch gefärbte Zellen.

Ergebnisse der Membranfärbung auf der Zelllinie Me260 (SSX2⁺, HLA-A*0201⁻):

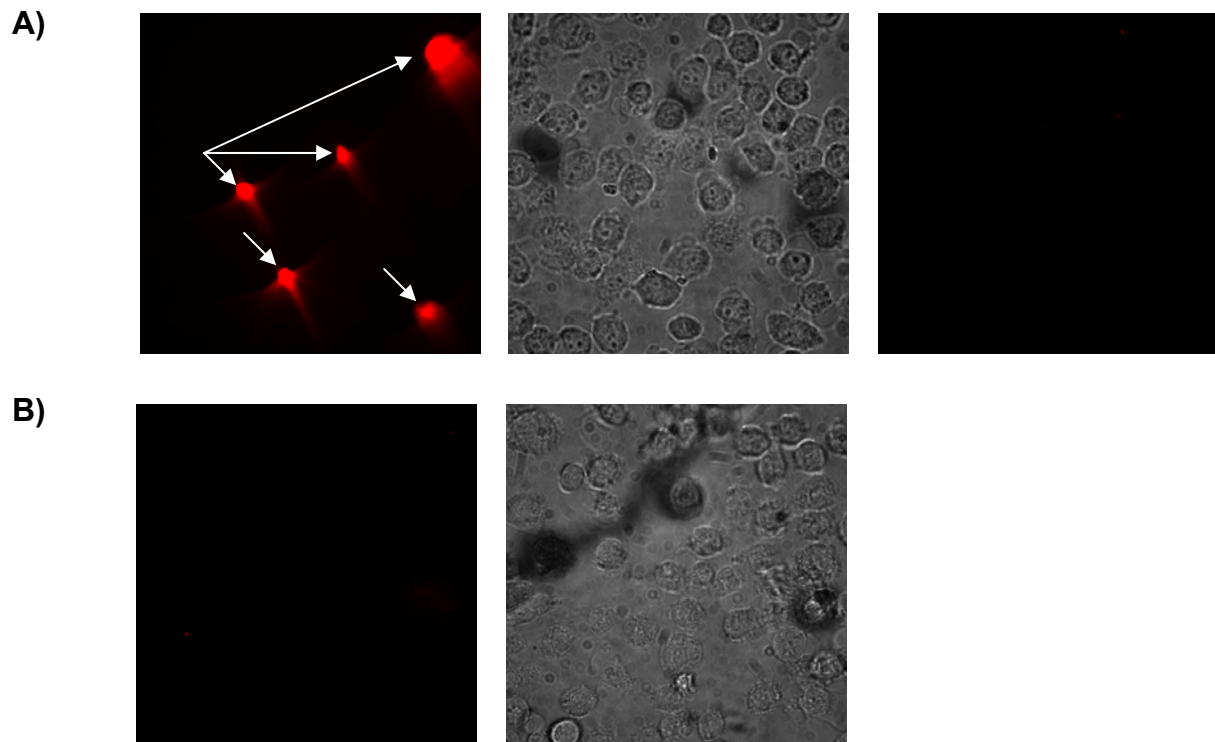
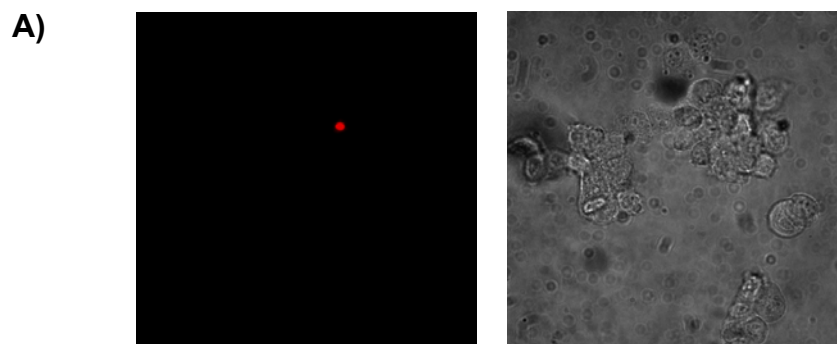


Abb. 48: Oberflächenfärbung der „Negativlinie“ Me260 (Vergrößerung: 40x); **A)** Visualisierung des SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit Fab3-b (links und rechts); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (Mitte); **B)** Visualisierung des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit FabVIE1-b (links); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (rechts); weiße Pfeile: durch unspezifische Aggregation von Farbstoffen entstandene Artefakte

Ergebnisse der Membranfärbung auf der Zelllinie T47D (SSX2⁺, HLA-A*0201⁻):



B)

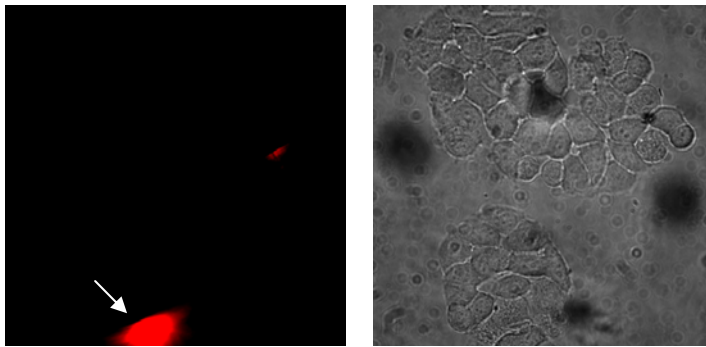
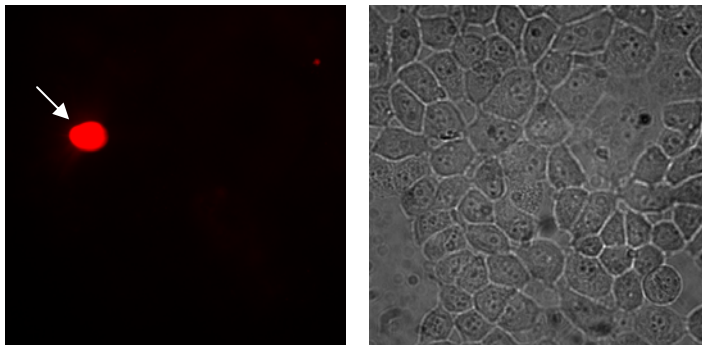


Abb. 48: Oberflächenfärbung der „Negativlinie“ T47D (Vergrößerung: 40x); A) Visualisierung des SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit Fab3-b (links); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (rechts); **B)** Visualisierung des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit FabVIE1-b (links); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (rechts); weißer Pfeil: durch unspezifische Aggregation von Farbstoffen entstandene Artefakte

Ergebnisse der Membranfärbung auf der Zelllinie MCF7 (SSX2⁻, HLA-A*0201⁺):

A)



B)

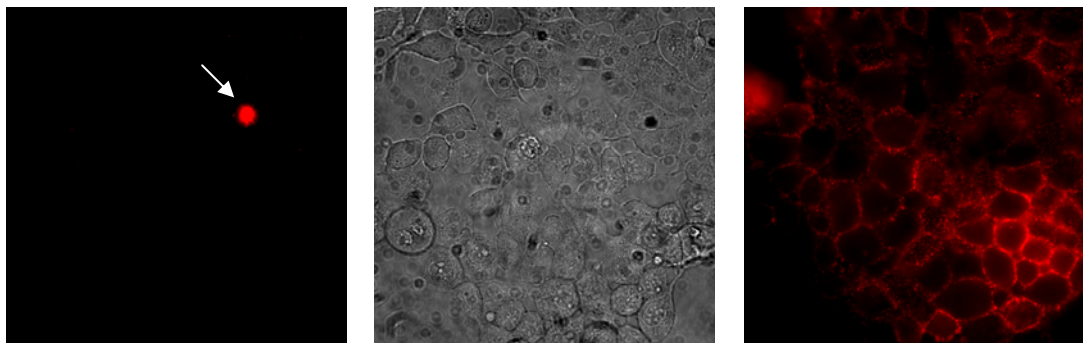


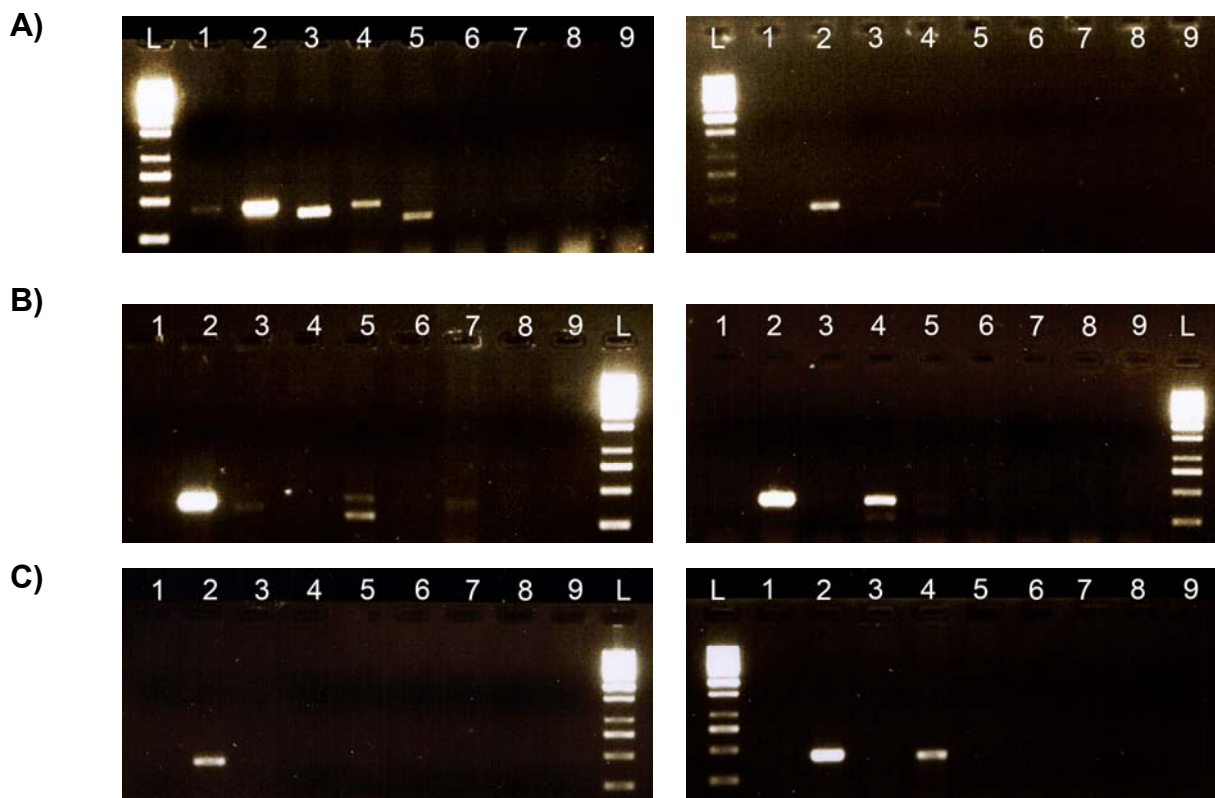
Abb. 49: Oberflächenfärbung der „Negativlinie“ MCF7 (Vergrößerung: 40x); A) Visualisierung des SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 Komplexes: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit Fab3-b (links); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (rechts); **B)** Visualisierung des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 Komplexes sowie der HLA-A*0201 Schwereketten: repräsentative Aufnahmen der Färbung mit FabVIE1-b (links); Durchlichtaufnahme zum linken Bild (Mitte); anti-HLA-A*0201 IgG BB7.2 (rechts); weiße Pfeile: durch unspezifische Aggregation von Farbstoffen entstandene Artefakte

Die Färbungen der als Negativkontrolle verwendeten Zelllinien, welche entweder SSX2- oder HLA-A*0201-negativ waren, ergaben keine charakteristische Membranfärbung. Vereinzelt fanden sich Streptavidin-PE-Aggregate.

7.5.2. Untersuchung der Expression SSX-kodierender RNA und des SSX-Proteins

Eine intrazelluläre Darstellung des SSX2-Proteins sollte über die RT-PCR hinausgehende Informationen bezüglich der Intensität und Heterogenität der Proteinexpression der untersuchten Zelllinien liefern.

Da sich die Expression vieler Gene von Zellen unter Kulturbedingungen im zeitlichen Verlauf ändern kann, wurde parallel die RNA-Expression der Gene der SSX-Familie untersucht. Hierzu wurde eine kleine Fraktion der Zellen aus der identischen Kulturflasche abgesondert, ihre RNA extrahiert und wie im Kapitel 7.5.1 beschrieben amplifiziert. Die Expression von SSX2-kodierender RNA war in den Linien Me290, Me275 und SK-Mel-37 konstant. Die Expression anderer Gene der SSX Familie änderte sich jedoch im zeitlichen Verlauf. Als Negativkontrolle wurde die Mausfibroblastenlinie 3T3 verwendet.



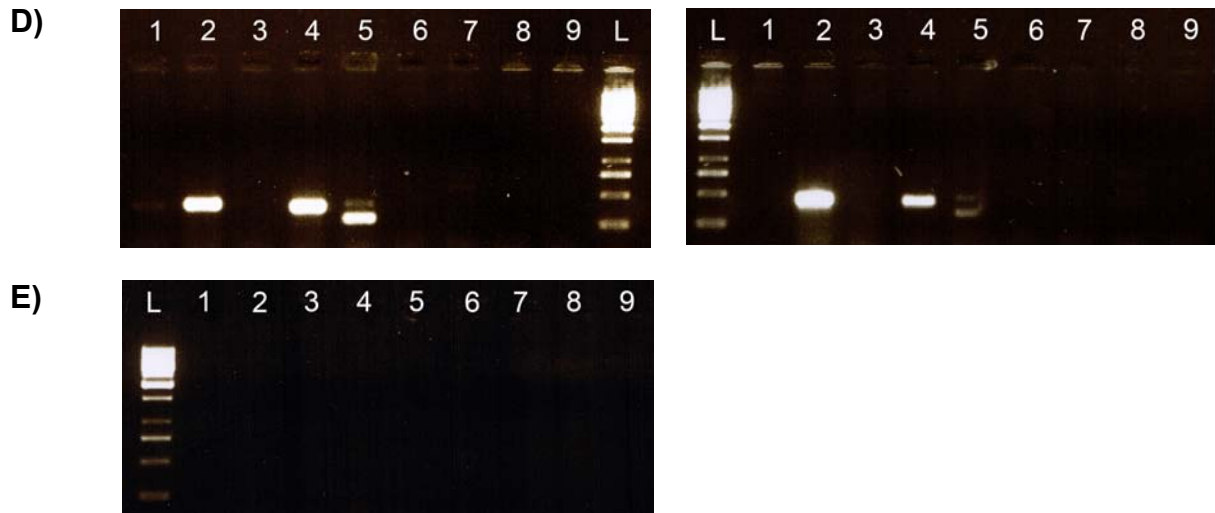
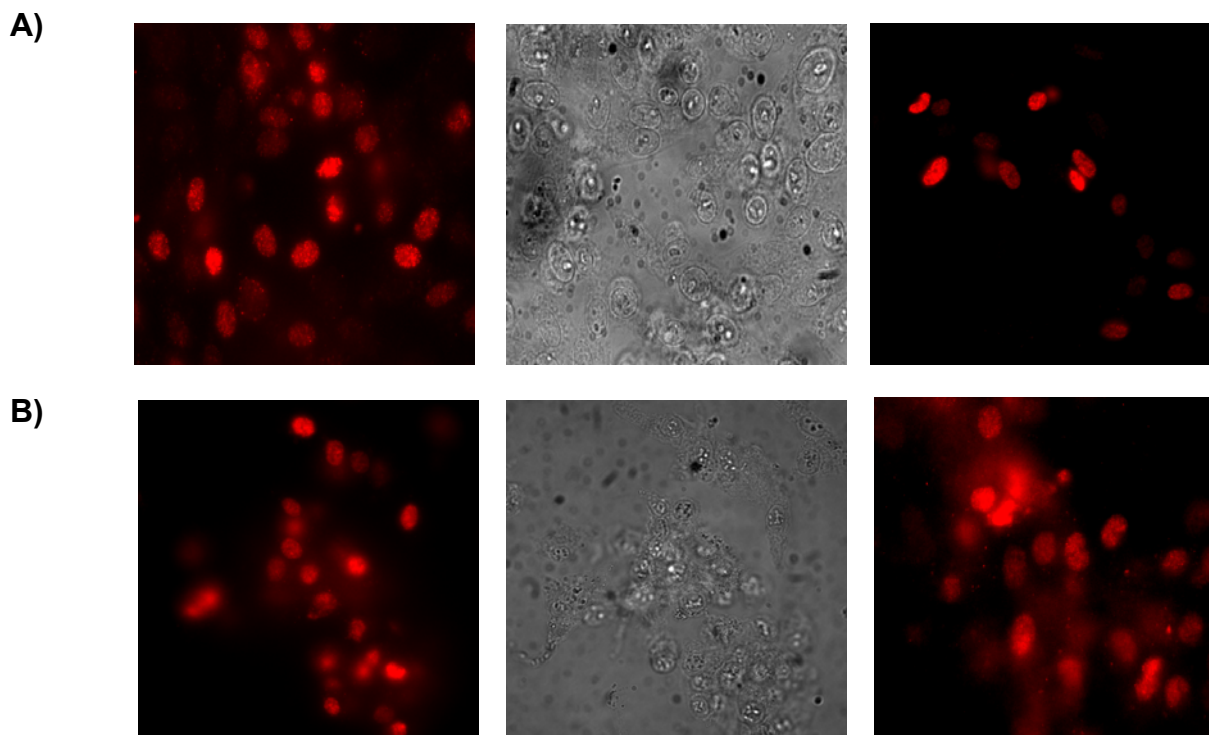


Abb. 50: Analyse der SSX-Expression verschiedener Tumorzelllinien mittels RT-PCR; **A)** Me290 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten; **B)** Me275 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten; **C)** SK-Mel-37 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten; **D)** links: T47D; rechts: Me260; **E)** 3T3

Die Ergebnisse der intrazellulären Färbung mit dem murinen Antikörper E3AS sind im Anschluss exemplarisch abgebildet. Als Negativkontrolle diente die Maus-fibroblastenlinie 3T3:



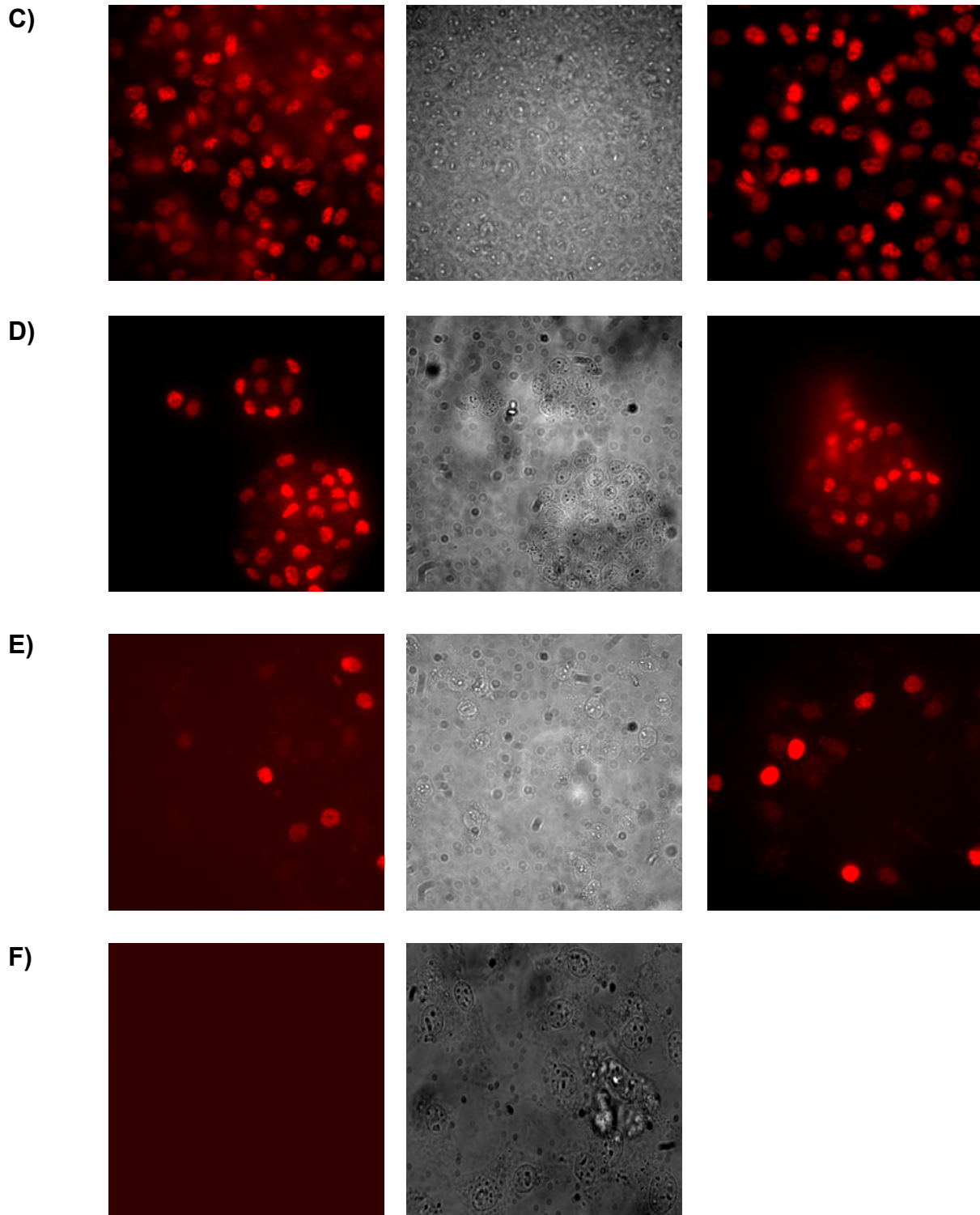


Abb. 51: Intrazelluläre Färbung mit dem murinen monoklonalen Antikörper E3AS (Vergrößerung: 40x); Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Proteinexpression (linkes und rechtes Bild); Mitte: jeweilige Durchlichtaufnahme zum linken Bild; **A)** Me290; **B)** Me275; **C)** SK-Mel-37; **D)** T47D; **E)** Me260; **F)** 3T3

Nach Durchführung der intrazellulären Färbungen kann man Folgendes konstatieren: Bei der Zelllinie Me290 zeigte sich eine Proteinexpression, die zwischen einzelnen Zellen stark differierte. So färbten sich einige Zellen sehr intensiv an, andere wiesen keine Färbung auf. Zudem ließ sich auch die geringere SSX-RNA-Expression bei der zweiten Färbung fluoreszenzmikroskopisch auf Proteinebene nachvollziehen (Abb. 50A). Die Zelllinie Me275 zeigte zu beiden Färbezeitpunkten eine gleich starke SSX-Protein-Expression. Weiterhin variierte die SSX-Protein-Expression zwischen den einzelnen Zellen nicht so stark wie bei der Zelllinie Me290. Die Zelllinie SK-Mel-37 wies die stärkste SSX-Protein-Expression auf. Zu beiden Zeitpunkten waren alle Zellen gefärbt. Die wegen fehlender HLA-A*0201-Expression als Negativkontrolle verwendete Linie T47D exprimierte ebenfalls auf hohem Level SSX-Protein und es kamen fast alle Zellen fluoreszenzmikroskopisch zur Darstellung. Trotz des in der RT-PCR ähnlichen RNA-Expressionsmodells der Zelllinien T47D und Me260 zeigte sich bei Letzterer ein differierendes Bild in der Fluoreszenzmikroskopie: Es kamen nicht alle Zellen fluoreszenzmikroskopisch zur Darstellung, und der intrazelluläre Gehalt an SSX-Protein variierte zwischen den einzelnen Zellen stark. Die Mausfibroblasten, welche als Negativkontrolle dienten, zeigten keine Färbung mit dem Klon E3AS.

7.5.3. Simultane Detektion der Präsentation von SSX2₄₁₋₄₉ und SSX2₁₀₃₋₁₁₁ im Kontext von HLA-A*0201

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob und inwieweit beide Epitope gleichzeitig auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden die SSX2-positiven Zelllinien Me275 und SK-Mel-37 simultan mit dem unbiotinylierten Fab-Antikörper Fab3 und dem biotinylierten Fab-Antikörper VIE1-b gefärbt. Eine Doppelfärbung der Zelllinie Me290 wurde aufgrund der geringen Präsentation beider Epitope, insbesondere des SSX2₄₁₋₄₉, nicht durchgeführt.

Wie in den vorhergehenden Kapiteln wurde zur Überprüfung der SSX-RNA-Expression eine RT-PCR zum Zeitpunkt der Färbung durchgeführt, deren Ergebnisse aus Abbildung 52 hervorgehen:

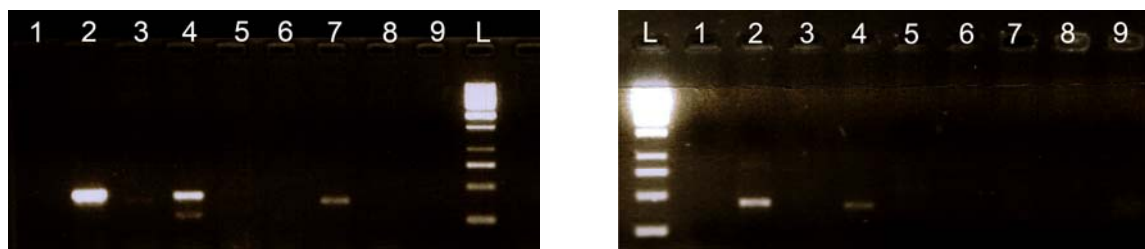
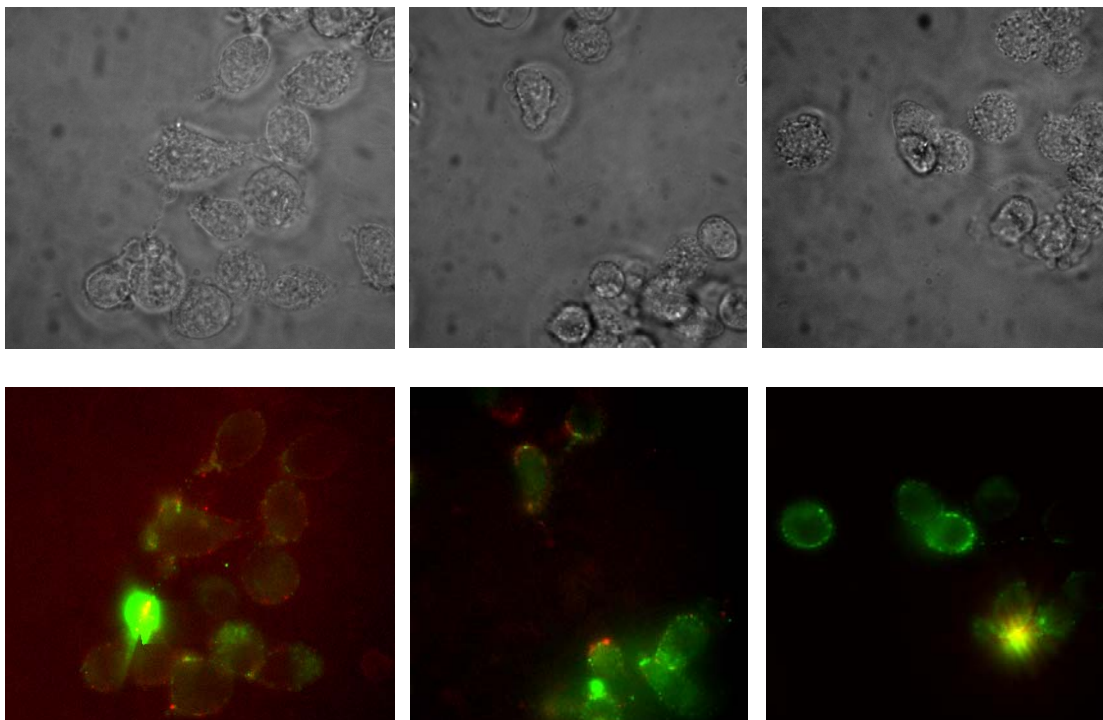


Abb. 52: Analyse der SSX-Expression der Zelllinien Me275 (links) sowie SK-Mel-37 (rechts) mittels RT-PCR

Nachfolgende Abbildung zeigt die Oberflächenfärbung mit den beiden Klonen FabVIE1-b und Fab3. Hierbei erfolgte die Visualisierung des unbiotinylierten Fab3 mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), die des biotinylierten FabVIE1 mit Phycoerythrin (PE). Die Detektion wurde unter Anwendung eines FITC- bzw. TRITC-Filtersatzes vorgenommen. Die Farbstoff- und Filterkombination wurde so gewählt, dass ein sog. „Double Staining“ ausgeschlossen war. Das bedeutet: Werden mehrere Farbstoffe in einer Probe verwendet, gilt es darauf zu achten, dass einerseits eine ungenügende Trennung der Anregungswellenlängen (sog. „Cross Talk“), bei der es zur gleichzeitigen Anregung beider Farbstoffe käme, vermieden wird. Andererseits sollte auch eine ungenügende Trennung der Emissionswellenlängen (sog. „Bleed through“), bei der die beiden Farbstoffe nicht mehr vom Photomultiplier unterschieden werden können, ausgeschlossen sein.

A)



B)

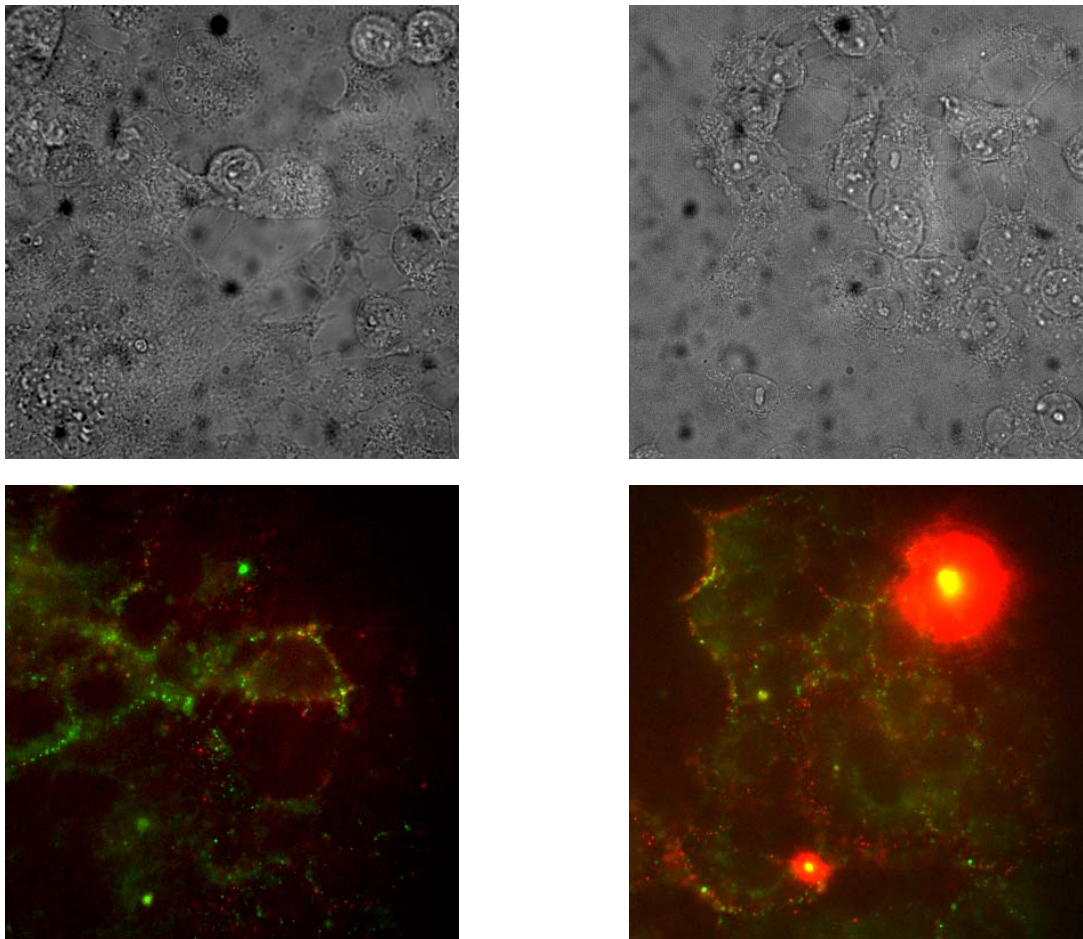


Abb. 53: Simultane Detektion zweier HLA-A*0201-restringierter Epitope von SSX auf der Tumorzelllinie A) Me275 und B) Sk-Mel-37 (Vergrößerung: 40x); Der SSX₂₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201 Komplex ist mit Fab3 (grün) und der SSX₂₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 Komplex mit FabVIE1-b (rot) visualisiert worden; obere Reihe: jeweilige Durchlichtaufnahme zur fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme der unteren Reihe

Wenige Zellen der Linie Me275 zeigten eine gleichzeitige Präsentation beider Epitope des SSX2-Proteins (Abb. 53A, linke und mittlere Aufnahme). SSX₂₄₁₋₄₉ wurde im Kontext von HLA-A*0201 auf nahezu allen Zellen präsentiert, was kongruent mit den Ergebnissen aus Kapitel 7.5.1 ist. Mit diesen Ergebnissen ebenfalls kongruent präsentierten nur wenige Zellen beide Epitope, d.h. SSX₂₁₀₃₋₁₁₁ wurde nur auf etwa 0,1-1% der Me275-Zellen präsentiert.

Im Gegensatz zur Zelllinie Me275 zeigte die Zelllinie SK-Mel-37 deutlich mehr Zellen, welche eine simultane Präsentation beider Epitope aufwiesen. Allerdings ließ sich auch bei dieser Zelllinie eine stärkere Präsentation des Epitops p41-49 nachweisen.

7.5.4. Detektion der SSX-RNA-Expression und Präsentation beider MHC-Peptid-Komplexe nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

In einem letzten Schritt wurden die Auswirkungen einer Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) auf das RNA-Expressionslevel sowie auf die Präsentation beider HLA-A*0201-restringierter Epitope untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen über insgesamt 72 Stunden mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor in einer Konzentration von 0,1 μ M behandelt. Da die Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin mit einer Halbwertszeit von etwa 7 Stunden relativ instabil ist, erfolgte alle 24 Stunden im Rahmen eines Mediumwechsel ein erneuter Zusatz.

Aus Abbildung 54 geht die SSX-RNA-Expression vor und nach Behandlung mit dem Zytostatikum hervor:

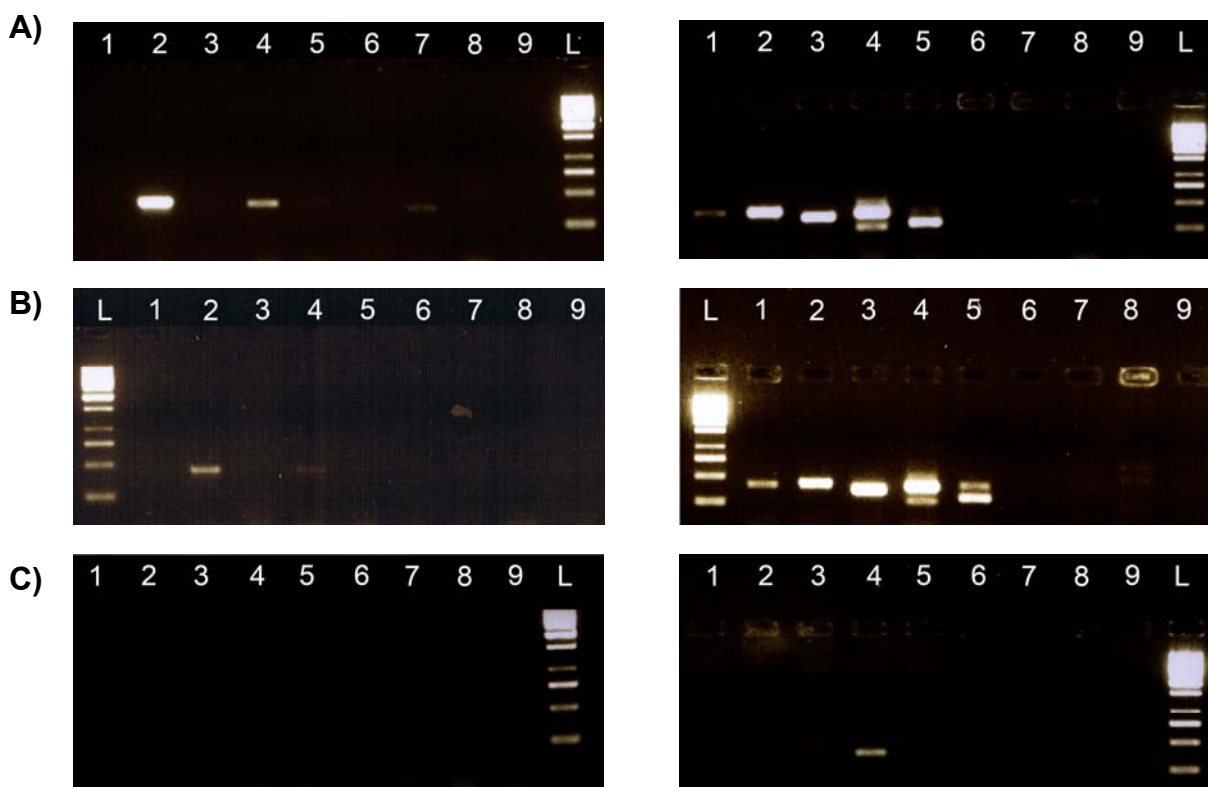


Abb. 54: Analyse der SSX-RNA-Expression der Zelllinien A) Me275 , B) Me290 und C) SK-Mel-37 vor (linke Abbildung) und nach (rechte Abbildung) Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Man kann unschwer erkennen, dass eine Behandlung mit dem Pyrimidinanalogon 5-Aza-2'-Deoxycytidin einerseits die schon vorhandene RNA-Expression erhöht und sich andererseits eine Expression weiterer SSX-Gene induzieren lässt. So kommt es

sowohl bei der Zelllinie Me275 als auch bei der Zelllinie Me290 zu einer zusätzlichen Expression von SSX1, 3 und 5 (ggf. sogar minimal SSX8). Nach Behandlung der Zelllinie SK-Mel-37, bei der ohne Behandlung zu diesem Zeitpunkt keinerlei SSX-Expression nachgewiesen werden konnte, wird eine SSX4-Expression induziert. Diese Versuchsergebnisse untermauern die Resultate von dos Santos et al., der zeigte, dass DAC in vitro eine Induktion der SSX-RNA- und SSX-Protein-Expression bewirkt (dos Santos et al., 2000).

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde der weitergehende Schritt unternommen, den Einfluss einer DAC-Behandlung auf die Präsentation der beiden SSX2-Epitope zu untersuchen. Diesbezüglich wurden die Zelllinien Me275, Me290 und SK-Mel-37 einer Oberflächenfärbung mit beiden Fab-Antikörpern vor und nach der Behandlung unterzogen. Da die Zelllinie SK-Mel-37 keine SSX-Expression bzw. nur eine Expression von SSX4 aufwies konnte, wie vermutet, mit keinem der beiden Klone eine SSX-Präsentation detektiert werden, so dass auf eine Darstellung dieser Färbung verzichtet wurde.

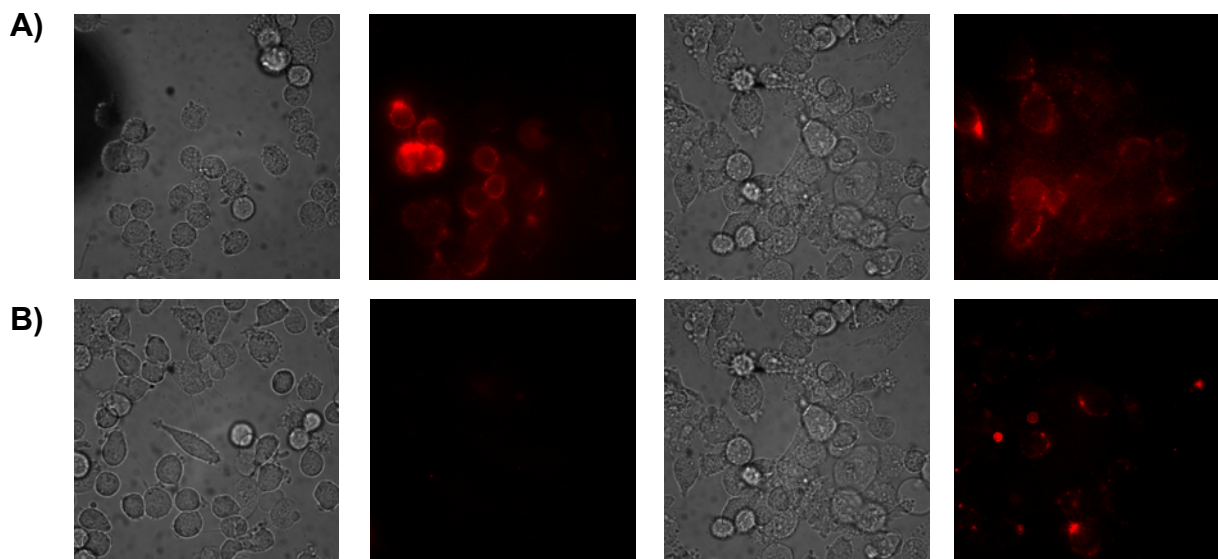


Abb. 55: Membranfärbung der Tumorzelllinie Me275 vor und nach Behandlung mit DAC; A) Färbung mit Klon Fab3-b; **B)** Färbung mit Klon VIE1-b; linke Hälfte: repräsentative Aufnahme vor Behandlung mit DAC; rechte Hälfte: repräsentative Aufnahme nach Behandlung mit DAC

Vergleicht man die Färbungen auf der Tumorzelllinie Me275 vor und nach Behandlung mit DAC, so kommt man zu folgendem Schluss: Die Membranfärbung mit Klon Fab3-b vor der Behandlung, bei der, wie in Kapitel 7.5.1 beschrieben, sehr viele Zellen angefärbt waren, ließ sich durch eine DAC-Behandlung nicht intensivieren, son-

dern war tendenziell sogar schwächer ausgeprägt. Das bedeutet, dass es eher zu einer Herunterregulation der Präsentation von SSX2₄₁₋₄₉ im Kontext von HLA-A*0201 kam. Im Kontrast hierzu stand die Färbung mit Klon VIE1-b: Vor der Behandlung fanden sich höchsten 0,1% Zellen mit einer erkennbaren Membranfärbung, nach der Behandlung waren es etwa 1-10% der Zellen, die eine schwache Oberflächenfärbung zeigten. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es nach der DAC-Behandlung zu einer vermehrten Prozessierung des Peptidfragments SSX2₁₀₃₋₁₁₁ kommt, die zu Lasten der SSX2₄₁₋₄₉-Prozessierung geht. Weiterhin wurde das Verhalten der Antigenprozessierung der Linie Me290 vor und nach DAC-Behandlung überprüft, die im nativen Zustand eine sehr ineffiziente Prozessierung beider Epitope aufwies.

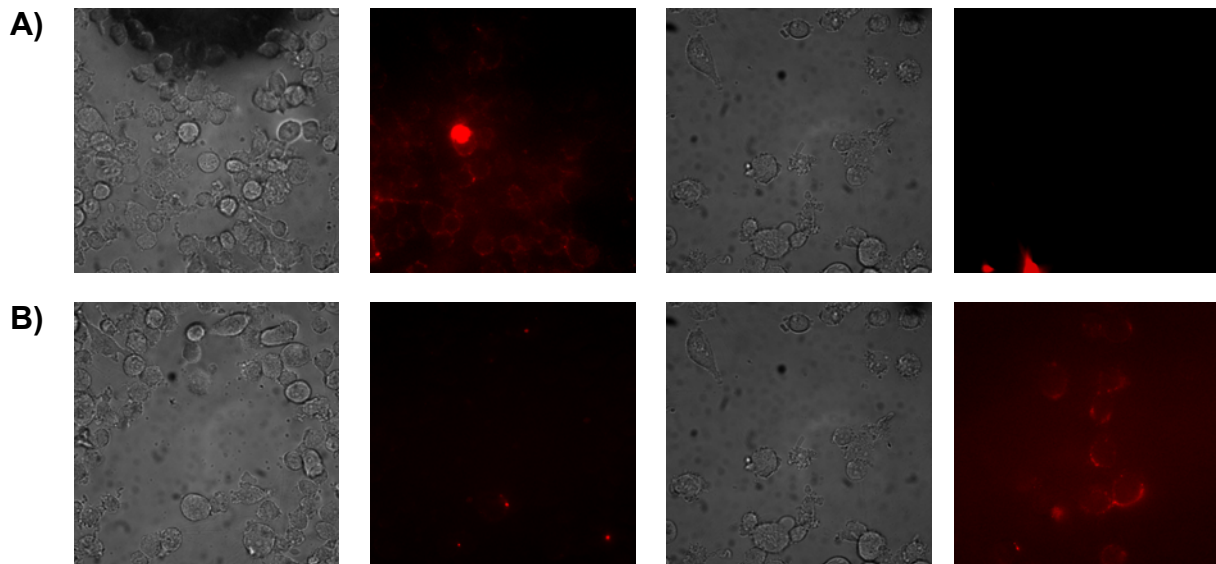


Abb. 56: Membranfärbung der Tumorzelllinie Me290 vor und nach Behandlung mit DAC

A) Färbung mit Klone Fab3-b; **B)** Färbung mit Klon VIE1-b; linke Hälfte: repräsentative Aufnahme vor Behandlung mit DAC ; rechte Hälfte: repräsentative Aufnahme nach Behandlung mit DAC

Wie schon bei der Zelllinie Me275 kommt es nach der Behandlung mit dem Zytostatikum DAC zu einer deutlichen Zunahme der Präsentation des Epitops SSX2₁₀₃₋₁₁₁ sowie zu einer verminderten Präsentation von SSX2₄₁₋₄₉ durch HLA-A*0201-Komplexe.

Abschließend lässt sich konstatieren, dass auf beiden Zelllinien nach der DAC-Behandlung das gleiche Phänomen auftritt: Die SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Präsentation nimmt stark zu, diejenige von SSX2₄₁₋₄₉ verhält sich genau gegenläufig.

Diskussion

1. *MHC-Peptid-Spezifität der selektierten Fab-Antikörper*

Antikörper interagieren spezifisch mit ihrer Zielstruktur, in der Regel unprozessierte Proteine oder Glykoproteine. T-Zellrezeptoren erkennen hingegen kleine Fragmente prozessierter Proteine in Form antigener Peptide, die im Kontext eines MHC-Komplexes präsentiert werden. Eine Herstellung von Antikörpern mit derartiger Spezifität durch konventionelle Vakzinierung ist überwiegend frustan verlaufen.

Inzwischen gelang es mehrfach mit Hilfe der Phage-Display-Technologie, Antikörper zu generieren, die in Analogie eines T-Zell-Rezeptors spezifisch ein Peptid im Kontext eines MHC Klasse I-Komplexes erkennen. Konkret sind dies HLA-A*0201-restringierte Epitope von Virus- und Tumorantigenen (Held et al., 2004; Held et al., 2007; Wadle et al., 2006). Die Generierung derartiger MHC-Peptid-spezifischer Antikörper bietet den Vorteil, dass im Gegensatz zur T-Zell-Reifung und damit zur T-Zell-Rezeptor-Entwicklung keine Co-Rezeptoren oder andere zelluläre Mechanismen eine Rolle spielen. Dies hat zur Folge, dass die Peptid-spezifische Interaktion derartiger Antikörper nicht durch solche Mechanismen determiniert ist.

In gleicher Weise wurden im vorliegenden Fall Fab-Antikörper selektiert, welche die Epitope SSX2₄₁₋₄₉ und SSX2₁₀₃₋₁₁₁ spezifisch im HLA-A*0201-Kontext erkennen. Die Fab-Antikörper reagieren im ELISA unter Verwendung rekombinanter biotinylierter MHC-Monomere als Antigen nur gegen solche, die das relevante Epitop SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉ präsentieren. Im Anschluss wurde das Bindungsverhalten der Fab-Antikörper gegenüber nativen MHC-Peptid-Komplexen, wie sie auf eukaryontischen Zellen präsentiert werden, überprüft. Als Antigen-präsentierende Zellen dienten HLA-A*0201-positive T2-Zellen und EBV-immortalisierte B-Lymphoblasten, die mit den entsprechenden Peptiden inkubiert wurden. Die Mehrzahl der Fab-Antikörper (12/16 der SSX2₁₀₃₋₁₁₁-spezifischen, 2/3 der SSX2₄₁₋₄₉-spezifischen Fab-Antikörper) detektierte mittels Durchflusszytometrie den entsprechenden MHC-Peptid-Komplex auf HLA-A*0201-positiven Zellen. Auf diese Weise wurde der Beweis erbracht, dass es sich bei den getesteten Klonen einerseits um eine Peptid-spezifische Interaktion mit dem MHC-Komplex handelt, und dass andererseits die Interaktion der Fab-

Antikörper allelspezifisch ist. So wurden keine HLA-A*0201-negativen EBV-immortalisierte B-Zellen, die mit dem entsprechenden Peptid beladen waren, erkannt. Eine möglichst umfangreiche und präzise Darstellung der Spezifität war für die weiterführenden Analysen von großem Interesse, um eine eventuell vorliegende Kreuzreaktivität der Antikörper weitgehend auszuschließen. Gänzlich lässt sich jedoch eine derartige Kreuzreaktivität nicht ausschließen, wie einerseits die durchflusszytometrischen Analysen auf nativen Tumorzellen und andererseits die Interaktion mit anderen Mitgliedern der SSX-Familie nahe legen. Das genannte Potential eines Fab-Antikörpers zur unspezifischen Bindung an andere Strukturen ist umso größer, je weniger affin der eigentliche Bindungspartner erkannt wird und je höher die strukturelle Ähnlichkeit beider Antigene ist. Aus diesem Grund lässt sich die Kreuzreaktivität der Fab-Antikörper gegen einzelne Mitglieder der SSX-Familie durch ihre sehr hohe Homologie gut erklären. Die Kreuzreaktivität gegenüber nicht bekannten Strukturen auf nativen Tumorzelllinien lässt sich am ehesten damit erklären, dass ein entsprechendes Antigen zwar mit sehr viel niedrigerer Affinität gebunden wird, es jedoch dadurch relevant wird, dass es in wesentlich größerer Menge vorliegt als der untersuchte MHC-Peptid-Komplex. Eine alternative, plausiblere Erklärungsmöglichkeit ist, dass es unter den speziellen experimentellen Bedingungen der Durchflusszytometrie zu einer unspezifischen Adhärenz, einem „Kleben“, also keiner spezifischen Antikörper/Antigen-Interaktion der Fab-Antikörper auf der Zellmembran kommt. Hierfür spricht die niedrige Signalintensität. Das Problem war jedoch unter anderen experimentellen Bedingungen wie der Fluoreszenzmikroskopie nicht evident.

Ein unspezifisches Bindungsverhalten ist nicht nur in der Diagnostik und Therapie mit Antikörpern relevant sondern auch von medizinischem Interesse. Als Beispiele seien hier nur die Kreuzallergie zwischen Birkenpollen und Äpfeln genannt sowie die Bildung von Antikörpern, welche mit körpereigenen Strukturen kreuzreagieren und somit für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen von Bedeutung sind.

2. Bindungsmodus der Fab-Antikörper gegen SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201

Überraschenderweise konnten die Antikörper von vier gegen den SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201 selektionierten Klonen den nativen MHC-Peptid-Komplex auf Zellen nicht detektieren, obgleich sich die Höhe ihrer Signalintensität im ELISA nicht von derjeni-

gen anderer Klone unterschied. Diese Klone wurden im Verlauf der Arbeit als „in vitro-Binder“ bezeichnet und ihr Bindungsverhalten im Vergleich zu dem der „Nativ-Binder“ näher analysiert. Zunächst wurde der Hypothese nachgegangen, dass die „in vitro-Binder“ möglicherweise eine deamidierte Variante des SSX2-Peptids erkennen. Diese Vermutung stützte sich auf das bereits bekannte Phänomen, dass T-Zell-Klone gegen das immundominante Peptid HEL₄₈₋₆₂, die durch Stimulation mit APCs, welche mit löslichem Peptid beladen waren, gewonnen wurden, keinerlei Reaktivität mehr gegen das Peptid aufwiesen, wenn es nach endogener Prozessierung präsentiert wurde (McAdam et al., 2001). Ursächlich war eine als spontane chemische Reaktion ablaufende Deamidierung eines Asparagins, welche nur stattfindet, wenn das Peptid in Lösung vorliegt, nicht jedoch während der endogenen Prozessierung. Eine Deamidierung des Glutamins von SSX2₁₀₃₋₁₁₁ hätte als spontane chemische Reaktion bei der Faltung der rekombinanten MHC-Peptid-Komplexe ablaufen können, so dass in der Lösung eine nicht-deamidierte und eine deamidierte Form vorgelegen hätten. Somit wären im Rahmen der Selektion der Phagenbank Antikörper gegen beide Varianten selektioniert worden. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, indem die Antigen-präsentierenden Zellen mit der deamidierten Variante des Peptids, bei der Glutamin durch Glutamat ausgetauscht war, gepulst wurden.

Ein weiterer Gedanke war, dass sich das Bindungsverhalten der „in vitro-Binder“ in der Art unterscheidet, dass diese im Kontrast zu den „Nativ-Bindern“ vorwiegend mit dem c-terminalen Ende des Peptids interagieren. Dieser Hypothese lag folgender Gedankengang zu Grunde: Es ist bekannt, dass die Schwereketten des in humanen Zellen exprimierten und präsentierten MHC Klasse I-Komplexes glykosyliert ist. Diese Glykosylierungsstelle befindet sich in der c-terminalen Verlängerung der Längsachse des Peptides, an Asn86. Jener Glykanrest ist dafür verantwortlich, dass der MHC nicht im endoplasmatischen Retikulum retiniert, sondern über das trans-Golgi Kompartiment an die Zelloberfläche transloziert wird (Miyazaki et al., 1986). Hierzu sind konformationsunabhängige Interaktionen des monoglykosylierten Glykans mit Calreticulin mitverantwortlich (Wearsch et al., 2004). Für eine weitere funktionelle Relevanz des am MHC Klasse I-Komplex gebundenen Oligosaccharids finden sich in der Literatur nur sehr wenige systematische Untersuchungen. Seine Größe und Lokalisation verhindert wahrscheinlich unspezifische Protein-Protein-Interaktionen und eine Formation von Aggregaten (Rudd et al., 2001). Besagter Glykanrest befindet

sich also in räumlicher Nähe zum c-terminalen Ende des Peptids. Durch die Größe des Oligosaccharids wäre es denkbar, dass eine Interaktion mit diesem Teil der Schwerkette sterisch unmöglich ist. Insbesondere wäre wahrscheinlich keine Peptidspezifische Interaktion mit dem MHC-Komplex über das äußere c-terminale Ende möglich.

Eine Glykankette fehlt hingegen bei rekombinanten und in vitro gefalteten MHC-Peptid-Komplexen, deren Schwerkette in *E. coli* exprimiert wird. Hiermit ließe sich also erklären, dass die „in vitro-Binder“ nur an die in vitro gefalteten MHC-Peptid-Komplexe binden können, da diese keine Glykankette tragen, welche die „in vitro-Binder“ an ihrer Bindung sterisch hindert. Ebenso würde diese Vermutung begreiflich machen, warum der Inhibitionsversuch auf MHC-Peptid-gekoppelten Beads trotz nachgewiesener Bindung der „in vitro-Binder“ auf den Beads nicht gelang. Die „in vitro-Binder“ könnten nur mit dem äußersten c-terminalen Ende des Peptides interagieren und somit die Bindungsstelle des T-Zell-Rezeptors nicht blockieren, der präferentiell mit der zentralen Region des Peptides interagiert. Die „Nativ-Binder“ würden in identischer oder ähnlicher Weise mit dem Peptid interagieren wie ein T-Zell-Rezeptor, so dass konsekutiv eine Interaktion des T-Zell-Rezeptors blockiert wäre und es nicht zu einer T-Zell-Aktivierung käme. Im Gegensatz hierzu wären die „in vitro-Binder“ aufgrund ihres Bindungsmodus, der sich beträchtlich von demjenigen eines T-Zell-Klons unterscheiden würde, nicht zu einer Inhibition fähig. Diese Beobachtung wäre insofern interessant, als die bisher beobachtete Form der T-Zell-Rezeptor-MHC-Peptid-Bindung erheblich durch die Glykosylkette beeinflusst würde.

Um die vermutete Existenz verschiedener Bindungsmodi der Fab-Antikörper zu zeigen, wurden die relevanten Kontaktpunkte aller Klone durch Mutagenisierung des SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Peptids und der HLA-A*0201 Schwerkette erarbeitet und ein „Footprint“ zweier „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ erstellt. Unsere Analysen ergaben keine Anhaltspunkte für ein unterschiedliches Bindungsverhalten einzelner Klone. Vielmehr binden alle Fab-Antikörper in ähnlicher Weise an den MHC-Peptid-Komplex. Kritische Punkte für die Fab-MHC-Peptid-Interaktion stellen die Positionen Ala150, Arg65 und insbesondere Lys66 der HLA-A*0201-Schwerkette dar. Ähnliche Ergebnisse erzielte in diesem Zusammenhang Baker et al., dem es gelang, „hot spots“ in der α_1 - und α_2 -Domäne zu definieren, die präferentiell mit dem T-Zell-Rezeptor interagieren (Baker et al., 2001). Es sind dies konkret die Positionen Arg65, Lys66 und Gln155, von de-

nen hauptsächlich Lys66 im vorliegenden Fall für die Fab-MHC-Peptid-Interaktion von entscheidender Bedeutung war. Demzufolge ist die Evidenz erbracht, dass alle in der vorliegenden Arbeit selektionierten Fab-Antikörper in gleicher Weise, analog einem T-Zell-Rezeptor an den MHC-Peptid-Komplex binden.

Eine Erklärung für das Phänomen der „in vitro-Binder“ fand sich erst im Rahmen der Analysen der Bindungskinetiken der selektionierten Fab-Antikörper mittels Oberflächenplasmonresonanz: Es zeigte sich eine deutliche Diskrepanz der Affinitäten zwischen den „Nativ-“ und „in vitro-Bindern“. Während die „Nativ-Binder“, die auch in der Lage waren, T-Zellen zu inhibieren, eine sehr hohe Affinität aufwiesen, lag die der „in vitro-Binder“ um ein bis zwei Zehnerpotenzen tiefer. Daher kann man postulieren, dass nur ein Antikörper-Molekül mit identischer Spezifität, jedoch höherer Affinität dazu in der Lage ist, einen T-Zell-Rezeptor an seiner Bindung zu hindern.

Diese Tatsache könnte im Hinblick auf eine immunsuppressive Therapie zur Vermeidung einer Transplantatabstoßung von Bedeutung sein. Es existieren Pharmaka, die entweder direkt oder indirekt auf eine Hemmung von T-Zellen abzielen. Jedoch birgt die Behandlung mit diesen Immunsuppressiva viele Nachteile. Eine schwere Nebenwirkung stellt das gehäufte Auftreten viraler, bakterieller sowie mykotischer Infektionen dar. Zudem sind die Patienten von opportunistischen Infektionen bedroht, wie sie auch im Rahmen einer AIDS-Erkrankung vorkommen. Zuletzt führt eine immunsuppressive Therapie nachweislich zu einer erhöhten Inzidenz maligner Neoplasien (Andres, 2005). Eine wünschenswerte Alternative zu den zurzeit zur Verfügung stehenden Pharmaka wären solche mit einer höheren Selektivität. Derartige Medikamente müssten dazu in der Lage sein, lediglich die T-Zellen zu inhibieren, die eine Transplantatabstoßung bzw. eine GvHD hervorrufen. Eine peptidspezifische Blockade von MHC Klasse I- bzw. MHC Klasse II-Komplexen könnte eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen bzw. von T-Helferzellen verhindern. Eine kompetitive Verdrängung des T-Zell-Rezeptors von seinem MHC-Peptid-Komplex scheint aus pharmakologischer Sicht praktikabel: Einerseits ist die T-Zell-Rezeptor-Interaktion mit einer $K_d < 200 \mu\text{M}$ von geringer Affinität (van der Merwe et al., 2003), so dass eine Verdrängung gemäß den vorliegenden Daten möglich sein sollte. Andererseits werden die Peptide in sehr geringer Kopienzahl auf der Zelloberfläche präsentiert (Engelhard et al., 2002; Purbhoo et al., 2006). MHC-Peptid-spezifische Antikörper,

wie die hier generierten „Nativ-Binder“, sind insofern interessante Kandidaten für eine spezifische Immuntherapie.

3. Detektion des MHC-Peptid-Komplexes nach endogener Prozessierung

Eine Detektion endogen prozessierter und auf der Zelloberfläche präsentierter TAA gestaltet sich prinzipiell sehr schwierig. Dies liegt maßgeblich daran, dass einzelne Peptide in nur sehr geringer Kopienzahl auf der Zelloberfläche präsentiert werden (in der Regel weniger als 100 pro Zelle) und sie damit je nach angewandter Methode häufig unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Zusätzlich entwickeln Tumorzellen verschiedene Escape-Mechanismen, mit deren Hilfe sie sich einem Angriff durch das Immunsystem entziehen können. Häufig findet sich beispielsweise eine Downregulation von MHC Klasse I-Molekülen bis hin zum völligen Verlust der HLA Klasse I-Expression (Cabrera et al., 1996; Cabrera et al., 1998; Cabrera et al., 2000). Eine derartige Veränderung ist für 15% der Melanome, 12% der Pharynxkarzinome, 14% der kolorektalen Karzinome, 40% der Harnblasenkarzinome und 25% der Mammakarzinome (Serrano et al., 2001) beschrieben. Einer der Mechanismen für eine generelle Downregulation aller HLA Klasse I-Moleküle ist eine Mutation des β_2 -Mikroglobulins (Benitez et al., 1998; Bicknell et al., 1994; D'Urso et al., 1991). Ebenso wurde ein selektiver Verlust einzelner HLA-Allele beobachtet (Ramal et al., 2000). Nicht zu vernachlässigen ist auch eine Downregulation der Untereinheiten des Proteasomenkomplexes sowie der Peptidtransporter TAP-1 und TAP-2, die an der Prozessierung und dem Transport von Peptiden in das endoplasmatische Retikulum beteiligt sind (Cromme et al., 1994; Johnsen et al., 1999). Die beschriebenen Modifikationen sind bekannt bei kleinzelligen Lungenkarzinomen, Prostatakarzinomen und Nierenzellkarzinomen (Korkolopoulou et al., 1996).

Im Fall des MHC Klasse I-Weges haben bereits mehrere Arbeitsgruppen die Frage nach der Effizienz der Antigenprozessierung und -präsentation bearbeitet. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass es sich bei der Antigenprozessierung um einen extrem ineffizienten Prozess handelt.

Diese hohe Ineffizienz mag an der immensen Komplexität des Prozesses liegen, der ablaufen muss, bis es zu einer Präsentation kommt. So müssen vom Proteasom produzierte Peptidfragmente eine definierte Länge aufweisen, um effizient mit TAP in-

teragieren zu können und danach Zugang zum ER zu erlangen (Momburg et al., 1994). Weiterhin weiß man, dass einem Peptid nur wenige Sekunden bleiben um nach der Synthese mit dem TAP zu interagieren, ansonsten wird es durch zytosolische Aminopeptidasen degradiert (Princiotta et al., 2003). Weitere Untersuchungen ergaben, dass für die Formation eines einzigen stabilen MHC Klasse I-Komplexes zwischen 994 und 3.122 Proteinmolekülen degradiert werden müssen (Princiotta et al., 2003). Fruci et al. (Fruci et al., 2003) untersuchten den postproteasomalen Prozess und hier insbesondere den Anteil des Proteinpools, der für die Präsentation auf der Zelloberfläche zur Verfügung steht. Sie stellten fest, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Präsentation und der Affinität eines Peptidepitops zum TAP besteht. Während Epitope mit hoher Affinität im Verhältnis 1:100 präsentiert wurden, wurden solche mit niedriger Affinität nur im Verhältnis 1:10.000 präsentiert. Eine langjährige Frage war, wie effizient einzelne Schritte der Antigen-Prozessierung ablaufen. Cascio et al. (Cascio et al., 2001) konnten diesbezüglich zeigen, dass bestenfalls eines von zehn degradierten Ovalbuminmolekülen vom Proteasom so geschnitten wurde, dass das immundominante Epitop SIINFEKL entstand.

Aufgrund der Tatsache, dass zudem die Mehrzahl der HLA-Moleküle mit solchen Proteinen beladen ist, die eine hohe Syntheserate aufweisen, wie beispielsweise ribosomale Proteine oder Hitzeschockproteinen (Jardetzky et al., 1991), leuchtet ein, dass die Präsentation MHC Klasse I restringierter Epitope tumorassoziierter Antigene aufgrund ihrer wesentlich geringeren Expressionsrate noch deutlich ineffizienter ist. Beispielsweise stellte man bei der Untersuchung der Prozessierungseffizienz des Tumorantigens Melan A (Held et al., 2007) fest, dass insgesamt 1.100-2.600 antigene Peptide synthetisiert werden müssen, bis ein MHC-Peptid-Komplex präsentiert wird. Wird das präsentierte Peptid nun noch aus dem gesamten Melan A-Protein prozessiert, so ist die Effizienz mit 16.000-52.000 benötigten Proteinmolekülen, um einen einzigen MHC-Peptid-Komplex zu detektieren, noch etwa 10- bis 20-fach geringer. Der natürlich von Tumorzellen prozessierte EAA/HLA-A*0201-Komplex konnte sogar mit keinem der selektionierten Fab-Antikörper detektiert werden, was wiederum die bekannt niedrige Kopienzahl des Peptids bestätigt.

Ein weiteres Beispiel stellt die Visualisierung des NY-ESO-1-Peptids mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie dar (Purbhoo et al., 2006): NY-ESO-1-positive Tu-

morzellen präsentierten gerade einmal 10-50 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅-Epitope auf ihrer Zelloberfläche.

Demnach ist es kaum verwunderlich, dass ein valider Nachweis der Antikörperbindung auf Tumorzellen durchflusszytometrisch nicht gelang. Unter Verwendung des sensitiveren und spezifischeren Verfahrens der Fluoreszenzmikroskopie war es dennoch möglich, eine spezifische Membranfärbung mit beiden Antikörpern zu etablieren.

Beachtlich war das Ergebnis, dass nur eine sehr geringe Anzahl an Zellen der Zelllinie Me275 eine Färbung mit dem Fab-Antikörper VIE1-b aufwiesen. Dies bedeutet letztendlich, dass das SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Epitop trotz des eindeutigen Nachweises einer SSX2-Protein-Expression kaum auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Hingegen wiesen fast alle Zellen eine spezifische Membranfärbung mit dem Klon Fab3-b auf. Diese Feststellung steht im Einklang mit den Daten, die mit CD8⁺ T-Zellen auf dieser Zelllinie erzielt wurden: Der SSX2₁₀₃₋₁₁₁-spezifische T-Zell-Klon zeigte keine Reaktion gegenüber dieser Zelllinie, wohingegen die SSX2₄₁₋₄₉-spezifische T-Zell-Linie eine starke Reaktivität aufwies. Eine sehr kleine Fraktion von etwa 0,1-1% der Me275-Zellen präsentierte jedoch das SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Epitop. Offensichtlich reichte die geringe Anzahl nicht aus, um eine messbare T-Zell-Aktivierung zu identifizieren. Warum ein Verlust der SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Präsentation bei diesen Zellen nicht evident ist, ist unklar. Eine Charakterisierung der zugrunde liegenden Mechanismen würde eine therapeutische Option eröffnen, um die Größe des Repertoires der präsentierten Epitope auf Tumoren und damit die Immunogenität zu erhöhen.

Im Gegensatz kamen bei der Zelllinie SK-Mel-37 fast alle Zellen sowohl mit dem SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-spezifischen Fab-Antikörper VIE1-b als auch mit dem SSX2₄₁₋₄₉ / HLA-A*0201-spezifischen Fab3-b zur Darstellung, wobei eine stärkere Färbung erneut mit dem Fab3-b erzielt werden konnte. Gleichermaßen korrelieren die Resultate erneut mit den T-Zell-Daten. Es konnte sowohl für SSX2₁₀₃₋₁₁₁-spezifische zytotoxische T-Zellen (Wagner et al., 2003) als auch für SSX2₄₁₋₄₉-spezifische T-Zellen (Ayyoub et al., 2002) eine Reaktivität auf der Tumorzelllinie SK-Mel-37 demonstriert werden.

Einen weiteren interessanten Aspekt bot die Untersuchung der Melanomzelllinie Me290, bei der mit beiden Fab-Antikörpern nur bei extrem wenigen Zellen eine Membranfärbung nachweisbar war. Erwähnenswert ist dies vor allem aufgrund der

sowohl mittels RT-PCR als auch mit Hilfe der intrazellulären Färbung mit dem monoklonalen Antikörper E3AS nachgewiesenen Anwesenheit des SSX2-Proteins. Diese Feststellung ist erneut kongruent zu der Beobachtung, dass für keinen der CD8⁺ T-Zell-Klone je eine Reaktivität auf dieser Zelllinie nachgewiesen werden konnte. Aus der vorangehenden Darstellung der Ergebnisse lässt sich Folgendes ableiten: Insgesamt scheint bei den zytotoxischen T-Zellen ein bestimmter Anteil an Zellen erforderlich zu sein, die das entsprechende Epitop präsentieren, um diese zu einer messbaren IFN γ -Ausschüttung zu veranlassen. Schon in früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl der MHC-Peptid-Komplexe, die zur Induktion einer T-Zell-Antwort erforderlich sind, mit weniger als 10 bis hin zu mehreren 1.000 MHC-Peptid-Komplexen stark variiert (Kageyama et al., 1995).

Weiter geht aus den Beobachtungen der Zelllinie Me275 hervor, dass SSX2₄₁₋₄₉ wesentlich effizienter prozessiert und im HLA-A*0201-Kontext präsentiert wird als SSX2₁₀₃₋₁₁₁. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt mag sein, dass für die Präsentation des SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Epitops, bezogen auf die singuläre Zelle, ein höherer Schwellenwert für die Präsentation existiert. Dies bedeutet umgekehrt, dass ein höheres Expressionslevel an SSX2-Protein innerhalb der einzelnen Zelle erforderlich ist, bis es zur Präsentation dieses Epitops kommt. Ein derartiger Sachverhalt ließe sich zum Beispiel darauf zurückführen, dass SSX2₄₁₋₄₉ bzw. sein Vorläufer eine höhere Affinität zum TAP aufweist und somit ein weitaus höherer Anteil dieses Epitops auf die Zelloberfläche gelangt, während der größte Teil des SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Epitops durch Aminopeptidasen degradiert wird. Zudem kann man schlussfolgern, dass einzelne Epitope des gleichen Tumorantigens von verschiedenen Zelllinien bevorzugt exprimiert werden. Um eine abschließende Stellungnahme abzugeben, welches der beiden SSX2-Epitope das immundominante ist, sind weitere Untersuchungen auf verschiedenen Zelllinien erforderlich. Bezieht man nämlich die Ergebnisse der Färbung auf der Tumorzelllinie SK-Mel-37 in seine Betrachtungen mit ein, so stellt man fest, dass auf dieser Zelllinie SSX2₄₁₋₄₉ bevorzugt präsentiert wird. Dennoch präsentieren viele Zellen auch das SSX2₁₀₃₋₁₁₁-Epitop, so dass sich abschließend nicht sagen lässt, ob das SSX2₄₁₋₄₉ bei allen Zelllinien immundominant ist. Die hier angestellten Betrachtungen gelten zudem alle im Kontext von HLA-A*0201. Zur Beantwortung dieser Fragestellung stellen MHC-Peptid-spezifische Antikörper, wie sie im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, ein besonders geeignetes Werkzeug dar.

Schließlich gelang - soweit wir wissen - sogar erstmalig eine simultane Visualisierung zweier verschiedener Epitope desselben Tumorantigens auf den Melanomzelllinien Me275 und SK-Mel-37. Hiermit konnte für das CT-Antigen SSX2 nachgewiesen werden, dass Tumorzellen einerseits dazu in der Lage sind, beide Epitope eines TAA auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Andererseits konnte aber auch der Nachweis geführt werden, dass die Präsentation des einen Epitops nicht an die des anderen Epitops gekoppelt ist. Das bedeutet, dass auch sehr viele Tumorzellen detektiert werden konnten, die nur eines der beiden Epitope auf ihrer Zelloberfläche trugen.

4. Variabilität der Expression der SSX-Gen-Familie

Bemerkenswerter Weise zeigte sich im Rahmen der Untersuchungen eine extrem große Variabilität der SSX-RNA- und -Protein-Expression einzelner Tumorzelllinien. Die Tumorzelllinie Me290 wies einmal nur eine SSX2-RNA-Expression auf, ein anderes Mal exprimierte sie RNA der SSX-Mitglieder 1-5. Bei der Tumorzelllinie Me275 variierte die SSX-RNA-Expression in der Art, dass manchmal nur SSX2 und SSX4 mit Hilfe der RT-PCR nachzuweisen waren. Zeitweilig konnte auch die RNA-Anwesenheit von SSX 1-5 dokumentiert werden. Noch eindrucksvoller wird dies bei Betrachtung der Tumorzelllinie SK-Mel-37 im Verlauf der Fluoreszenzfärbungen. Die Melanomzelllinie SK-Mel-37, die zu Beginn der Versuchsreihe die SSX-Mitglieder 1, 2 und 4 exprimierte, verlor im weiteren Verlauf gänzlich ihre SSX-RNA-Expression. Eine Expression von SSX4-RNA ließ sich erneut nach Behandlung mit dem hypomethylierenden Agens DAC induzieren. Relativ stabil bezüglich ihres Expressionsmusters zeigten sich indessen die Mammakarzinomzelllinie T47D und die Melanomzelllinie Me260, bei denen mehrfach der Nachweis einer RNA-Expression von SSX2, 4 und 5 geführt werden konnte.

Ferner differierte das Expressionsmuster in normalem Hodengewebe von demjenigen, das von Güre et al. zuvor beschrieben wurde (Güre et al., 2002). Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir zusätzlich die mRNA von SSX8 und sehr schwach auch SSX9 detektieren, so dass wir Güre et al. nicht zustimmen können, die diese Gene trotz struktureller Vollständigkeit funktionell Pseudogenen gleichsetzen (Güre et al., 2002). Diese Forschungsergebnisse ließen sich allerdings durch unterschiedliche Kulturbedingungen und eine höhere Sensitivität infolge eines differierenden experimentellen Aufbaus erklären. Übereinstimmende Ergebnisse fanden sich im Bezug auf die Expression des SSX6-Proteins, welches als einziges Mitglied

der SSX-Familie auch im Rahmen unserer Versuchsreihe nicht nachweisbar war. Zudem kann man die Feststellung von Güre et al. erhärten, dass die SSX-Mitglieder SSX1, 2 und 4 wesentlich häufiger als die SSX-Mitglieder SSX3, 5 und 6 im Tumorgewebe vorkommen.

Die Tatsache, dass sich auch bei den von uns untersuchten Tumorzelllinien keinerlei Expression von SSX6, 8 und 9 sowie nur sehr selten eine Expression von SSX7 fand, mag erklären, warum diese Mitglieder der SSX-Familie wesentlich später entdeckt wurden.

Eine derart variable Expression von CT-Antigenen konnten Neumann et al. auch für EBV-transformierte B-Zellen (LCLs) nachweisen (zur Veröffentlichung anstehend). Sie untersuchten die Expression von 12 verschiedenen CT-Genen mit Hilfe einer RT-PCR an 20 LCL-Linien verschiedener Spender. Bemerkenswert war, dass obwohl eine Expression von CT-Antigenen in LCLs bis heute nicht beschrieben wurde, 80% der etablierten LCLs mindestens eines der untersuchten CT-Gene exprimierten. Das am häufigsten exprimierte CT-Gen war mit 60% SSX4, gefolgt von SSX1 (45%) und MAGE-3 (40%). Die CT-Gene SSX2, GAGE und SCP-1 wurden in etwa 30% der untersuchten LCL-Linien exprimiert. Interessanterweise korrelierte die Expression der CT-Gene weder mit der Kulturdauer, noch mit der Telomeraseaktivität, der Aneuploidie oder der Proliferationsrate der untersuchten Zellen. Ebenso fand sich keine Korrelation zwischen der CT-Expression und spezifischen Charakteristika der LCLs, wenn man sie, wie von Sugimoto et al. vorgeschlagen (Sugimoto et al., 2004), in „(post-)immortal“ und „prä-immortal“ unterteilte. Zusammenfassend muss man konstatieren, dass die Mechanismen, die der CT-Gen-Expression zu Grunde liegen wesentlich komplexer sind, als zuvor angenommen wurde.

Abschließend muss man auf die immunologische Problematik einer derartig variablen Expression von Tumorantigenen eingehen. Diese stellt eine weitere Erklärung für das wohl bekannte Problem der Immunkontrolle von Tumoren dar. Eine derartig variable Expression mit passagerem oder gänzlichem Verlust der Expression eines Tumorantigens, wie dies für die Zelllinie SK-Mel-37 gezeigt werden konnte, stellt einen weiteren Mechanismus im Sinne eines Escapes dar. So ist bekannt, dass es im Rahmen von Tumorerkrankungen nicht selten zu einer peripheren T-Zell-Anergie kommt. Weiterhin stellt der hier beschriebene Verlust der Expression eines Tumorantigens keineswegs einen Einzelfall dar. Jäger et al. (Jager et al., 1997) wiesen anhand mehr-

fach gewonnener Biopsate von Metastasen im Rahmen vergleichender Analysen einen allmählichen Verlust der Melan A-Expression, in Abhängigkeit von der Tumorprogression, bei 4 von 5 Patienten nach.

Der Ansatz einer Tumorstimmung bleibt in jedem Fall infolge der variablen Expression sowie der oben beschriebenen geringen Präsentation von Tumorantigenen ein äußerst kompliziertes Vorhaben. Eine homogene Antigenexpression und -präsentation scheint eine entscheidende Grundvoraussetzung zu sein, um antigenspezifischen T-Zellen eine Lyse der Zielzellen zu ermöglichen und somit eine immunologische Selektion solcher Tumorzellen mit Antigenverlust zu vermeiden. Künftige Vakzinierungsversuche müssen also ihren Fokus einerseits darauf richten, die Expression von MHC I-Molekülen zu modulieren und andererseits einem Verlust tumorassoziierter Antigene effektiv vorzubeugen.

5. Erkenntnisse aus der Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

5-Aza-2'-deoxycytidin ist ein Pyrimidinanalogon, das während der Replikation in die DNA eingebaut wird. Als Konsequenz des Einbaus von DAC kommt es zu einer Hemmung der DNA-Methyltransferase und konsekutiv zu einer Demethylierung in der entsprechenden Sequenz, was zu einer Beeinflussung der für die Zellregulation verantwortlichen Proteine führt. Die Rolle einer DNA-Methylierung bei der Onkogenese wurde schon seit Jahren untersucht. Zahlreiche Arbeiten zeigten, dass die DNA-Methyltransferase-Aktivität häufig in Tumorzellen gesteigert ist. Die dabei entstehende Hypermethylierung hemmt die Transkription der Promotorregion verschiedener Tumorsuppressorantigene. Auf diese Weise kann eine DNA-Methylierung die Genaktivität modifizieren ohne eine Veränderung der Gensequenz hervorzurufen. Es wurde vermutet, dass die Hypermethylierung einen Schritt der von Knudson formulierten „Zwei-Treffer-Hypothese“ darstellt (Jones et al., 1999). Beispiele für häufig methylierte Gene sind das in Mamma- (Virmani et al., 2001), Lungen- und Ösophaguskarzinomen (Kawakami et al., 2000) vorkommende APC (adenomatous polyposis coli)-Gen, das in Mamma- (Dobrovic et al., 1997) und Ovarialkarzinomen (Chan et al., 2002) nachgewiesene BRCA1 (breast cancer 1)-Gen und das in einer Vielzahl von Tumoren exprimierte RASSF1A (Agathangelou et al., 2001) (Ras association domain family member 1)-Gen. Tumoren, in denen die Methylierung zahlreicher Gene gezeigt worden ist sind: Lungenkarzinome, gynäkologische Tumore (v.a. Mam-

makarzinome), hämatologische Malignome (Leukämien und Lymphome) und Nierenzellkarzinome.

Altevogt et al. gelang es, bei immunresistenten metastasierten Tumoren in Mäusen durch die Behandlung mit DAC eine Reexpression des Tumorantigens hervorzurufen, so dass diese wieder von spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt und lysiert wurden (Altevogt et al., 1986). Serrano et al. konnten weiterhin mit Hilfe einer DAC-Behandlung der Melanomzelllinie MSR3-mel nachweisen, dass die Hypermethylierung bei der Hemmung der Transkription von HLA Klasse I-Komplexen eine große Rolle spielt (Serrano et al., 2001).

Im Rahmen der Behandlung mit DAC demonstrierten wir, dass „die SSX-Promotoraktivität sensitiv für Methylierungen“ ist (Gure et al., 2002), wie dies schon für die CT-Antigene CTSP-1 (Parmigiani et al., 2006) und MAGE (De Smet et al., 1999) beschrieben ist. Jedoch ließen sich auch im vorliegenden Fall nur einzelne Mitglieder der Multigenfamilie induzieren. Betrachtet man beispielsweise die Melanomzelllinien Me275 und Me290, so waren vor der DAC-Behandlung lediglich SSX2 und SSX4 sowie bei der Zelllinie Me275 auch schwach SSX7 nachweisbar; nach der Behandlung jedoch SSX1-5 sowie schwach SSX8. Bei der Melanomzelllinie SK-Mel-37 ließ sich vor der DAC-Behandlung die mRNA keines der SSX-Proteine detektieren. Nach der Behandlung kam es zu einer Induktion von SSX4. Zusammenfassend gelang mit Hilfe einer DAC-Behandlung die Induktion der SSX-Mitglieder 1, 3, 4, 5 und 8.

Bei schon vorbestehender Expression von SSX2 und SSX4 ließ sich diese weiter steigern, mit der Folge, dass es zu einer fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Zunahme der Präsentation von SSX2₁₀₃₋₁₁₁ kam. Bemerkenswert ist allerdings, dass im HLA-A*0201-Kontext die Expression des Epitops SSX2₁₀₃₋₁₁₁ anstieg und diejenige des Epitops SSX2₄₁₋₄₉ gleich blieb oder sogar abnahm. Ein Erklärungsansatz für diesen Fakt wäre folgende Überlegung: Wie schon länger bekannt ist, existieren für MHC Klasse I-restringierte Peptide unterschiedliche Wege der Antigenprozessierung. Dahingehend besitzen konstitutive Proteasomen und Immunoproteasomen verschiedene Schnittmuster zur Degradierung ubiquitinylierter Proteine (Toes et al., 2001). Zudem sind mit der Cysteinprotease (Lopez et al., 1997) und der Tripeptidyl Peptidase II (Seifert et al., 2003) weitere Wege der Prozessierung von Antigenen beschrieben, welche sich im Zytosol abspielen. Die Translokation von Peptiden kann weiterhin TAP-abhängig oder TAP-unabhängig erfolgen. Hierbei ist der exakte Weg der

SSX2-Prozessierung noch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Präsentation der beiden Epitope SSX2₁₀₃₋₁₁₁ und SSX2₄₁₋₄₉ im HLA-A*0201-Kontext wäre, dass zur Präsentation von SSX2₁₀₃₋₁₁₁ ein bestimmter Grenzwert der Proteinexpression überschritten sein muss, was nach der DAC-Behandlung gewährleistet ist.

Weiterhin wiesen Güre et al. (Gure et al., 2002) nach, dass eine Induktion von SSX2 nach DAC-Behandlung auch bei Zelllinien möglich ist, die im nativen Zustand keine SSX-Expression aufweisen. Aufschlussreich wäre in diesem Zusammenhang, ob es nach einer Induktion von SSX2 ebenfalls zur Präsentation seiner HLA-A*0201 restringierter Epitope kommt und wenn ja ob nur das Epitop SSX2₁₀₃₋₁₁₁ auf der Oberfläche nachweisbar ist oder gar beide.

Aus dem Sachverhalt, dass es nicht bei allen Mitgliedern der SSX-Familie zu einer Induktion kam, leiten wir die gleichen Schlussfolgerungen wie Güre et al. (Gure et al., 2002) ab, nämlich dass dies nicht der einzige Mechanismus einer Regulation der SSX-Expression sein kann. Dennoch stellt eine Behandlung mit DAC eine interessante Option in der Therapie SSX2-exprimierender Tumore dar. Durch eine Hemmung der DNA-Methyltransferase in Tumoren lässt sich eine Differenzierungsinduktion hervorrufen. Hierbei kommt es zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorantigenen, die für den Tumor einen Proliferationsvorteil darstellen. Anhand der verbesserten Detektion nach DAC-Behandlung mit dem Fab-Antikörper VIE1-b wird deutlich, dass eine Steigerung der SSX2-Expression auch eine gesteigerte Präsentation des SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-Komplexes zur Folge hat. Dies könnte man sich zu Nutze machen, wenn das Immunsystem infolge der sehr geringen Präsentation von Tumorantigenen eine Immuntoleranz entwickelt hat. So könnte sowohl die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen als auch die durch T-Helferzellen deutlich durch eine Behandlung mit DAC verbessert werden. Es könnte einerseits ein eventuell bestehender Defekt der HLA Klasse I-Präsentation behoben werden und andererseits die Expression und Präsentation von CT-Antigenen induziert werden. Es wurde schon kurz auf den Sachverhalt eingegangen, dass der gegen SSX2₁₀₃₋₁₁₁ spezifische T-Zell-Klon keine Reaktivität gegenüber der Melanomzelllinie Me275 zeigte. Dies führen wir darauf zurück, dass bei der Mehrheit der Zellen fluoreszenzmikroskopisch keine Präsentation von SSX2₁₀₃₋₁₁₁ / HLA-A*0201-Komplexen nachgewie-

sen werden konnte. Möglicherweise ließe sich jedoch nach der Behandlung mit DAC eine Reaktivität herstellen.

Da eine Demethylierung einen reversiblen Vorgang darstellt, werden Arzneimittel wie 5'-Azacytidin, Decitabin und Histondeacetylaseinhibitoren zur Behandlung einer Vielzahl von Tumoren eingesetzt (Das et al., 2004). Dennoch darf man aus diesen Resultaten nicht die falsche Schlussfolgerung ableiten, dass eine generelle Hypomethylierung eine Tumorentstehung vermeidet. Es ist bekannt, dass auch eine genomweite Hypomethylierung zur Entstehung verschiedener Tumore (Feinberg et al., 1983; Kim et al., 1994) beiträgt. Derartige Veränderungen treten häufig bei metastasierten Leberzellkarzinomen (Lin et al., 2001), Zervixkarzinomen (Kim et al., 1994), Prostatakarzinomen (Bedford et al., 1987) sowie hämatologische Malignomen auf (Ehrlich, 2002).

Der DNA-Hypermethylierungsinhibitor Decitabin (Dacogen[®]) kommt beispielsweise erfolgreich als Orphan drug zur Therapie des Myelodysplastischen Syndroms in den Vereinigten Staaten zum Einsatz. Dort wurde er im Mai 2006 durch die Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten, FDA (Food and Drug Administration) zugelassen. In Deutschland ist das demethylierende Analogon Azacytidin (Vidaza[®]) seit Dezember 2008 als Orphan Drug zur Therapie des myelodysplastischen Syndroms (MDS) bei Patienten mit intermediärem Risiko 2 oder hohem Risiko nach International Prognostic Scoring System (IPSS), bei der chron. myelomonozytäre Leukämie (CMML) mit 10-29% Knochenmarkblasten ohne myeloproliferative Störung und bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) mit 20-30% Blasten und Mehrlinien-Dysplasie gemäß WHO-Klassifikation zugelassen.

6. Perspektiven

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten und charakterisierten MHC-Peptidspezifischen Antikörper stellen eine erhebliche Erweiterung des Instrumentariums zur Bearbeitung von Fragestellungen der Antigen-Prozessierung und -Präsentation dar. Dies gilt sowohl für die Untersuchung der Immunantwort im physiologischen Kontext, als auch unter pathologischen Bedingungen wie beispielsweise in der Tumorummunologie.

Obwohl inzwischen eine Vielzahl an tumorspezifischen Antigenen identifiziert worden sind, die dazu in der Lage sind, sowohl eine B- als auch T-Zell-Antwort (Preuss et al., 2002; Van den Eynde et al., 1997a; Van den Eynde et al., 1997b) zu induzieren,

kommt es in der Realität nur sehr selten zur Zerstörung eines manifesten Tumors durch das Immunsystem eines Patienten. Neben potentiell ineffektiven Effektoormechanismen stellen Tumor-Escape-Mechanismen, auf die bereits mehrfach eingegangen wurde, ein gut fundiertes Erklärungsmodell dar. Ferner konnten wir zeigen, dass derartige Tumor-Escape-Mechanismen nicht zwangsläufig alle Epitope eines Tumorantigens betreffen. So kann es bei normaler MHC I-Expression auch zu einem partiellen Verlust der Präsentation einzelner T-Zell-Epitope kommen, während die Expression anderer erhalten bleibt. Unter Anwendung der SSX2-spezifischen Fab-Antikörper FabVIE1 und Fab3 konnten wir demonstrieren, dass es in der Melanomzelllinie Me275 zu einer sehr geringen, zum Teil völlig fehlenden, Präsentation des HLA-A*0201-restringierten Epitops SSX2₁₀₃₋₁₁₁ kam, während das Epitop SSX2₄₁₋₄₉ weiterhin homogen präsentiert wurde. Diese Feststellung ist insofern von Bedeutung, als neue therapeutische Strategien darauf abzielen könnten, gezielt das Repertoire präsentierter Epitope auf Tumorzellen zu vergrößern und damit eine wesentlich effektivere Lyse durch CTLs ermöglichen könnten. Die von uns generierten Fab-Antikörper ermöglichen nun detailliertere Untersuchungen dieses Phänomens.

Insbesondere im Falle des malignen Melanoms ist eine äußerst ineffektive Präsentation von Tumorantigenen sehr wahrscheinlich, da der Tumor zwar oft von T-Zellen infiltriert ist, es jedoch dennoch zu keiner nennenswerten Lyse der malignen Zellen kommt. Nichtsdestoweniger bleiben diese den Tumor infiltrierenden Lymphozyten (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) ein interessanter Ansatz im Hinblick auf eine erfolgreiche Therapie des Malignen Melanoms: Entnimmt man einem Patienten eine gewisse Menge dieser Lymphozyten, kultiviert und expandiert diese und transferiert diese erneut dem Patienten, so kommt es zu einer nachweisbaren Immunantwort (June, 2007).

Zusammenfassend stellen die von uns generierten und charakterisierten Fab-Antikörper Reagenzien mit exklusiver Spezifität dar, mit denen drängende tumorimmunologische Fragestellungen zukünftig bearbeitet werden können. Ihre Relevanz wird durch ihren potenziellen therapeutischen Einsatz weiter gesteigert.

Appendix

1. Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers	15
Abb. 2: Organisation des humanen Antikörperclusters	20
Abb. 3: Schematische Darstellung eines scFv-exprimierenden Phagenpartikels	35
Abb. 4: Schematische Darstellung des Prinzips der Selektionen	62
Abb. 5: Aufbau des Immunblot-Sandwiches beim Semi-Dry-Verfahren	74
Abb. 6: Aufbau eines CM5 Sensor-Chips (links) sowie des zugehörigen Flusssystems (rechts)	87
Abb. 7: Darstellung eines Sensorgramms	89
Abb. 8: Schematische Darstellung eines invertierten Mikroskops	92
Abb. 9: Fingerprints der 83 selektionierten Klone	100
Abb. 10: Visualisierung der Fab-Antikörper im Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie	103
Abb. 11: Spezifische Bindung der 16 Klone im ELISA auf immobilisierten HLA-A*0201-Komplexen, welche ein Panel verschiedener Peptide präsentieren	105
Abb. 12: Durchflusszytometrie der 16 Fab-Antikörper auf mit SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁ beladenen T2-Zellen	108
Abb. 13: Durchflusszytometrie am Beispiel der zwei besten Binder auf T2-Zellen, beladen mit einem Panel an Peptiden	109
Abb. 14: Durchflusszytometrie der drei besten Binder auf HLA-A*0201-positiven LCLs, beladen mit einem Panel an Peptiden	112
Abb. 15: Durchflusszytometrie der drei besten Binder auf HLA-A*0201-negativen LCLs beladen mit SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁	113
Abb. 16: Durchflusszytometrie der beiden Binder auf T2-Zellen, beladen mit einem Panel an Peptiden	115
Abb. 17: Durchflusszytometrie des Klons Fab3 auf HLA-A*0201-positiven LCLs, beladen mit einem Panel an Peptiden	116
Abb. 18: Durchflusszytometrie des Klons Fab3 auf HLA-A*0201-negativen LCLs beladen mit dem Peptid SSX2 ₄₁₋₄₉	117
Abb. 19: Spezifische Inhibition der CTL-Reaktivität auf exogen beladenen MCF7-Zellen	118
Abb. 20: Spezifische Inhibition der CTL-Reaktivität auf SK-Mel-37-Zellen	119
Abb. 21: Spezifische Inhibition der CTL-Reaktivität auf exogen beladenen MCF7-Zellen	121
Abb. 22: Spezifische Inhibition der CTL-Reaktivität auf Me275-Zellen	122
Abb. 23: Bindungsverhalten der „in vitro-Binder“ auf MHC-Peptid-gekoppelten Beads	124
Abb. 24: CTL-Inhibition auf MHC-Peptid-gekoppelten Streptavidin-Beads mit „Nativ-“ und „in vitro-Bindern“	125

Abb. 25: Bindungsverhalten der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ in der Durchflusszytometrie nach Glutamatsubstitution.....	126
Abb. 26: Bindungsverhalten der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ in der Durchflusszytometrie nach Alaninsubstitution	128
Abb. 27: Fab-Titration der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ im ELISA	129
Abb. 28: Bindungsverhalten der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ im ELISA nach Alaninsubstitution.....	132
Abb. 29: Bindungsverhalten der „Nativ-“ und „in vitro-Binder“ im ELISA nach Mutagenisierung der HLA-A*0201-Schwerkette.....	135
Abb. 30: Model eines HLA-A*0201-Komplexes mit Darstellung der Effekte verschiedener Mutagenisierungen der HLA-A*0201-Schwerkette auf das Bindungsverhalten zweier „Nativ-“ und „in vitro-Binder“	136
Abb. 31: Vektorkarte des Phagemid-Vektors pCES-1 vor und nach Klonierung der BirA-enzyma-tischen Biotinylierungsregion	139
Abb. 32: Restriktionsverdau der Klone VIE1 und Fab3 mittels NotI und EcoRI	140
Abb. 33: 1,5% Agarose-Gel zur Kontrolle der Klonierung des BirA-tags	140
Abb. 34: Western-Blot der Fab-Antikörper Fab3-b (1), Fab3 (2), VIE1-b (3), VIE1 (4)	142
Abb. 35: Peptidtitration auf T2-Zellen.....	143
Abb. 36: Peptidtitration auf MCF7-Zellen	145
Abb. 37: Peptidverdrängung SSX2₁₀₃₋₁₁₁ bzw. SSX2₄₁₋₄₉ versus CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃	147
Abb. 38: Sensorgramm des Klons VIE1	149
Abb. 39: Bindungskinetik der Klone A) IIIB1; B) VIIIE1; C) VIE1; D) IID2; E) Fab3	152
Abb. 40: Untersuchung der Kreuzreaktivität der Klone VIE1-b und Fab3-b gegenüber Mitgliedern der SSX-Familie nach exogener Beladung auf T2-Zellen	155
Abb. 41: Durchflusszytometrie der Klone VIE1, IID2 und Fab3 auf nativen Tumorzellen.....	157
Abb. 42: Durchflusszytometrie des Klons FabVIE1-b auf nativen und IFNγ-behandelten Tumorzellen	159
Abb. 43: Blockversuch auf exogen beladenen T2-Zellen sowie auf den „Positivlinien“ SK-Mel-37 und Me290	161
Abb. 44: Analyse der SSX-Expression verschiedener Tumorzelllinien mittels RT-PCR	163
Abb. 45: Oberflächenfärbung der Tumorzelllinie Me275 (Vergrößerung: 40x)	165
Abb. 46: Oberflächenfärbung der Tumorzelllinie SK-Mel-37 (Vergrößerung: 40x).....	166
Abb. 47: Oberflächenfärbung der Tumorzelllinie Me290 (Vergrößerung: 40x bzw. 100x).	167
Abb. 48: Oberflächenfärbung der „Negativlinie“ Me260 (Vergrößerung: 40x).....	168
Abb. 48: Oberflächenfärbung der „Negativlinie“ T47D (Vergrößerung: 40x).....	169
Abb. 49: Oberflächenfärbung der „Negativlinie“ MCF7 (Vergrößerung: 40x).....	169
Abb. 50: Analyse der SSX-Expression verschiedener Tumorzelllinien mittels RT-PCR	171
Abb. 51: Intrazelluläre Färbung mit dem murinen monoklonalen Antikörper E3AS (Vergrößerung: 40x).....	172

Abb. 52: Analyse der SSX-Expression der Zelllinien Me275 (links) sowie SK-Mel-37 (rechts) mittels RT-PCR	174
Abb. 53: Simultane Detektion zweier HLA-A*0201-restringierter Epitope von SSX auf der Tumorzelllinie A) Me275 und B) Sk-Mel-37 (Vergrößerung: 40x)	175
Abb. 54: Analyse der SSX-RNA-Expression der Zelllinien A) Me275 , B) Me290 und C) SK-Mel-37 vor (linke Abbildung) und nach (rechte Abbildung) Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin	176
Abb. 55: Membranfärbung der Tumorzelllinie Me275 vor und nach Behandlung mit DAC	177
Abb. 56: Membranfärbung der Tumorzelllinie Me290 vor und nach Behandlung mit DAC	178

2. Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: Angaben zu den verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	42
Tab. 2: Verzeichnis der Peptidepitope mit Angabe der Aminosäuresequenz und des SYFPEITHI-Scores (Rammensee et al., 1999).....	47
Tab. 3: Angaben zu den verwendeten Antikörpern und Färbereagenzien	49
Tab. 4: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.....	56
Tab. 5: V-, J-, D-Gene und Aminosäuresequenz der CDR3-Region der Schwerkette der untersuchten Klone	100
Tab. 6: V-, J-Gene und Aminosäuresequenz der CDR3-Region der Leichtkette der untersuchten Klone.....	102
Tab. 7: Bindungsparameter der Fab-Antikörper IIIB1, VIIIE1, VIE1, IID2 und Fab3	152
Tab. 8: SSX-Expression in Tumorzelllinien und Testisgewebe	164

3. Literaturverzeichnis

- Ackerman, A.L. & Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol*, **5**, 678-84.
- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12889-94.
- Agathangelou, A., Honorio, S., Macartney, D.P., Martinez, A., Dallol, A., Rader, J., Fullwood, P., Chauhan, A., Walker, R., Shaw, J.A., Hosoe, S., Lerman, M.I., Minna, J.D., Maher, E.R. & Latif, F. (2001). Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene*, **20**, 1509-18.
- Aharoni, R., Teitelbaum, D., Arnon, R. & Puri, J. (1991). Immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis by antibodies to the antigen-Ia complex. *Nature*, **351**, 147-50.
- Alexandroff, A.B., Jackson, A.M., Paterson, T., Haley, J.L., Ross, J.A., Longo, D.L., Murphy, W.J., James, K. & Taub, D.D. (2000). Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours. *Mol Immunol*, **37**, 515-26.
- Altevogt, P., von Hoegen, P. & Schirmacher, V. (1986). Immunoresistant metastatic tumor variants can re-express their tumor antigen after treatment with DNA methylation-inhibiting agents. *Int J Cancer*, **38**, 707-11.
- Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J. & Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, **274**, 94-6.
- Andres, A. (2005). Cancer incidence after immunosuppressive treatment following kidney transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol*, **56**, 71-85.
- Anichini, A., Molla, A., Mortarini, R., Tragni, G., Bersani, I., Di Nicola, M., Gianni, A.M., Pilotti, S., Dunbar, R., Cerundolo, V. & Parmiani, G. (1999). An expanded peripheral T cell population to a cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined, melanocyte-specific antigen in metastatic melanoma patients impacts on generation of peptide-specific CTLs but does not overcome tumor escape from immune surveillance in metastatic lesions. *J Exp Med*, **190**, 651-67.
- Ayyoub, M., Stevanovic, S., Sahin, U., Guillaume, P., Servis, C., Rimoldi, D., Valmori, D., Romero, P., Cerottini, J.C., Rammensee, H.G., Pfreundschuh, M., Speiser, D. & Levy, F. (2002). Proteasome-assisted identification of a SSX-2-derived epitope recognized by tumor-reactive CTL infiltrating metastatic melanoma. *J Immunol*, **168**, 1717-22.

- Baker, B.M., Turner, R.V., Gagnon, S.J., Wiley, D.C. & Biddison, W.E. (2001). Identification of a crucial energetic footprint on the alpha1 helix of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 that provides functional interactions for recognition by tax peptide/HLA-A2-specific T cell receptors. *J Exp Med*, **193**, 551-62.
- Balczon, R., Bao, L. & Zimmer, W.E. (1994). PCM-1, A 228-kD centrosome autoantigen with a distinct cell cycle distribution. *J Cell Biol*, **124**, 783-93.
- Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F. & Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell*, **14**, 9-20.
- Baum, H. (1995). Mitochondrial antigens, molecular mimicry and autoimmune disease. *Biochim Biophys Acta*, **1271**, 111-21.
- Bedford, M.T. & van Helden, P.D. (1987). Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Res*, **47**, 5274-6.
- Bellone, M., Iezzi, G., Rovere, P., Galati, G., Ronchetti, A., Protti, M.P., Davoust, J., Rugarli, C. & Manfredi, A.A. (1997). Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol*, **159**, 5391-9.
- Belyavsky, A., Vinogradova, T. & Rajewsky, K. (1989). PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells. *Nucleic Acids Res*, **17**, 2919-32.
- Benitez, R., Godelaine, D., Lopez-Nevot, M.A., Brasseur, F., Jimenez, P., Marchand, M., Oliva, M.R., van Baren, N., Cabrera, T., Andry, G., Landry, C., Ruiz-Cabello, F., Boon, T. & Garrido, F. (1998). Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens*, **52**, 520-9.
- Better, M., Chang, C.P., Robinson, R.R. & Horwitz, A.H. (1988). Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science*, **240**, 1041-3.
- Bevan, M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*, **143**, 1283-8.
- Bicknell, D.C., Rowan, A. & Bodmer, W.F. (1994). Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4751-5.

- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. & Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, **242**, 423-6.
- Bjorkman, P.J. & Parham, P. (1990). Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem*, **59**, 253-88.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. & Wiley, D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, **329**, 506-12.
- Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M.L., Brasseur, R., Renauld, J.C., Coulie, P., Boon, T. & van der Bruggen, P. (1995). BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity*, **2**, 167-75.
- Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaupt, G., Koszinowski, U.H. & Kloetzel, P.M. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med*, **179**, 901-9.
- Boon, T., Cerottini, J.C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **12**, 337-65.
- Borrebaeck, C.A. & Carlsson, R. (2001). Human therapeutic antibodies. *Curr Opin Pharmacol*, **1**, 404-8.
- Bothmann, H. & Pluckthun, A. (1998). Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression. *Nat Biotechnol*, **16**, 376-80.
- Brass, N., Heckel, D., Sahin, U., Pfreundschuh, M., Sybrecht, G.W. & Meese, E. (1997). Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma. *Hum Mol Genet*, **6**, 33-9.
- Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. & Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene*, **104**, 147-53.
- Breitling, F.a.S.D. (1997). *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Brode, S. & Macary, P.A. (2004). Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *Immunology*, **112**, 345-51.
- Brodin, B., Haslam, K., Yang, K., Bartolazzi, A., Xie, Y., Starborg, M., Lundeberg, J. & Larsson, O. (2001). Cloning and characterization of spliced fusion transcript variants of synovial sarcoma: SYT/SSX4, SYT/SSX4v, and SYT/SSX2v. Possible regulatory role of the fusion gene product in wild type SYT expression. *Gene*, **268**, 173-82.

- Brossart, P., Heinrich, K.S., Stuhler, G., Behnke, L., Reichardt, V.L., Stevanovic, S., Muhm, A., Rammensee, H.G., Kanz, L. & Brugger, W. (1999). Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood*, **93**, 4309-17.
- Brossart, P., Schneider, A., Dill, P., Schammann, T., Grunebach, F., Wirths, S., Kanz, L., Buhning, H.J. & Brugger, W. (2001). The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*, **61**, 6846-50.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, **112**, 195-203.
- Caballero, O.L. & Chen, Y.T. (2009). Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*.
- Cabrera, T., Angustias Fernandez, M., Sierra, A., Garrido, A., Herruzo, A., Escobedo, A., Fabra, A. & Garrido, F. (1996). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol*, **50**, 127-34.
- Cabrera, T., Collado, A., Fernandez, M.A., Ferron, A., Sancho, J., Ruiz-Cabello, F. & Garrido, F. (1998). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens*, **52**, 114-23.
- Cabrera, T., Salinero, J., Fernandez, M.A., Garrido, A., Esquivias, J. & Garrido, F. (2000). High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Hum Immunol*, **61**, 499-506.
- Campbell, R.D. & Trowsdale, J. (1993). Map of the human MHC. *Immunol Today*, **14**, 349-52.
- Cano, P., Fan, B. & Stass, S. (1998). A geometric study of the amino acid sequence of class I HLA molecules. *Immunogenetics*, **48**, 324-34.
- Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L. & Goldberg, A.L. (2001). 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *Embo J*, **20**, 2357-66.
- Chaga, G., Bochkariov, D.E., Jokhadze, G.G., Hopp, J. & Nelson, P. (1999). Natural poly-histidine affinity tag for purification of recombinant proteins on cobalt(II)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose. *J Chromatogr A*, **864**, 247-56.
- Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G. & Allison, J.P. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol*, **19**, 565-94.

- Chames, P., Hufton, S.E., Coulie, P.G., Uchanska-Ziegler, B. & Hoogenboom, H.R. (2000). Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1-MAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab library. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7969-74.
- Chan, K.Y., Ozcelik, H., Cheung, A.N., Ngan, H.Y. & Khoo, U.S. (2002). Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res*, **62**, 4151-6.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, **352**, 624-8.
- Clark, J., Rocques, P.J., Crew, A.J., Gill, S., Shipley, J., Chan, A.M., Gusterson, B.A. & Cooper, C.S. (1994). Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet*, **7**, 502-8.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. & Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*, **6**, 629-62.
- Cloutier, S.M., Couty, S., Terskikh, A., Marguerat, L., Crivelli, V., Pugnieres, M., Mani, J.C., Leisinger, H.J., Mach, J.P. & Deperthes, D. (2000). Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Mol Immunol*, **37**, 1067-77.
- Collet, J.F. & Bardwell, J.C. (2002). Oxidative protein folding in bacteria. *Mol Microbiol*, **44**, 1-8.
- Constant, S.L. & Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, **15**, 297-322.
- Costello, R.T., Gastaut, J.A. & Olive, D. (1999). Tumor escape from immune surveillance. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **47**, 83-8.
- Crew, A.J., Clark, J., Fisher, C., Gill, S., Grimer, R., Chand, A., Shipley, J., Gusterson, B.A. & Cooper, C.S. (1995). Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *Embo J*, **14**, 2333-40.
- Cromme, F.V., Airey, J., Heemels, M.T., Ploegh, H.L., Keating, P.J., Stern, P.L., Meijer, C.J. & Walboomers, J.M. (1994). Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med*, **179**, 335-40.
- Das, P.M. & Singal, R. (2004). DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*, **22**, 4632-42.

- Davis, M.M. & Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, **334**, 395-402.
- Davis, M.M., Lyons, D.S., Altman, J.D., McHeyzer-Williams, M., Hampl, J., Boniface, J.J. & Chien, Y. (1997). T cell receptor biochemistry, repertoire selection and general features of TCR and Ig structure. *Ciba Found Symp*, **204**, 94-100; discussion 100-4.
- de Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruine, A.P., Arends, J.W. & Hoogenboom, H.R. (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem*, **274**, 18218-30.
- De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V. & Boon, T. (1999). DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol*, **19**, 7327-35.
- Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N. & Shevach, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol*, **151**, 1224-34.
- Dobrovic, A. & Simpfendorfer, D. (1997). Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res*, **57**, 3347-50.
- dos Santos, N.R., Torensma, R., de Vries, T.J., Schreurs, M.W., de Bruijn, D.R., Kater-Baats, E., Ruiter, D.J., Adema, G.J., van Muijen, G.N. & van Kessel, A.G. (2000). Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res*, **60**, 1654-62.
- Dubel, S., Breitling, F., Fuchs, P., Braunagel, M., Klewinghaus, I. & Little, M. (1993). A family of vectors for surface display and production of antibodies. *Gene*, **128**, 97-101.
- D'Urso, C.M., Wang, Z.G., Cao, Y., Tatake, R., Zeff, R.A. & Ferrone, S. (1991). Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest*, **87**, 284-92.
- Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, **21**, 5400-13.
- Eichmuller, S., Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D. & Schadendorf, D. (2001). Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 629-34.
- Elliott, T., Smith, M., Driscoll, P. & McMichael, A. (1993). Peptide selection by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Curr Biol*, **3**, 854-66.

- Engelhard, V.H., Brickner, A.G. & Zarling, A.L. (2002). Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire. *Mol Immunol*, **39**, 127-37.
- Espinoza-Delgado, I. (2002). Cancer vaccines. *Oncologist*, **7 Suppl 3**, 20-33.
- Fahnestock, M.L., Tamir, I., Narhi, L. & Bjorkman, P.J. (1992). Thermal stability comparison of purified empty and peptide-filled forms of a class I MHC molecule. *Science*, **258**, 1658-62.
- Falk, K. & Rotzschke, O. (1993). Consensus motifs and peptide ligands of MHC class I molecules. *Semin Immunol*, **5**, 81-94.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, **301**, 89-92.
- Fenton, R.G. & Longo, D.L. (1997). Danger versus tolerance: paradigms for future studies of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 272-5.
- Ferrone, S. & Marincola, F.M. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today*, **16**, 487-94.
- Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T. & Ioannides, C.G. (1995). Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med*, **181**, 2109-17.
- Fooksman, D.R., Gronvall, G.K., Tang, Q. & Edidin, M. (2006). Clustering class I MHC modulates sensitivity of T cell recognition. *J Immunol*, **176**, 6673-80.
- Fruci, D., Lauvau, G., Saveanu, L., Amicosante, M., Butler, R.H., Polack, A., Ginhoux, F., Lemonnier, F., Firat, H. & van Endert, P.M. (2003). Quantifying recruitment of cytosolic peptides for HLA class I presentation: impact of TAP transport. *J Immunol*, **170**, 2977-84.
- Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. & Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*, **2**, 1096-103.
- Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L. & Wilson, I.A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*, **274**, 209-19.
- Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J.P., Van der Spek, C.W., Patard, J.J., Boon, T., Schrier, P. & Van den Eynde, B.J. (1996). A new gene

- coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics*, **44**, 323-30.
- Gauss, G.H. & Lieber, M.R. (1996). Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol*, **16**, 258-69.
- Germain, R.N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, **76**, 287-99.
- Geurts van Kessel, A., dos Santos, N.R., Simons, A., de Bruijn, D., Forus, A., Fodstad, O., Myklebost, O., Balemans, M., Baats, E., Olde Weghuis, D., Suijkerbuijk, R.F., van den Berg, E., Molenaar, W.M. & de Leeuw, B. (1997). Molecular cytogenetics of bone and soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, **95**, 67-73.
- Gilboa, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*, **11**, 263-70.
- Gilboa, E. (2001). The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy. *Nat Immunol*, **2**, 789-92.
- Goldberg, A.L. & Rock, K.L. (1992). Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*, **357**, 375-9.
- Gouttefangeas, C. & Rammensee, H.G. (2000). Problem solving for tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol*, **18**, 491-2.
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. & Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, **425**, 397-402.
- Gure, A.O., Tureci, O., Sahin, U., Tsang, S., Scanlan, M.J., Jager, E., Knuth, A., Pfreundschuh, M., Old, L.J. & Chen, Y.T. (1997). SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int J Cancer*, **72**, 965-71.
- Gure, A.O., Wei, I.J., Old, L.J. & Chen, Y.T. (2002). The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. *Int J Cancer*, **101**, 448-53.
- Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D. & Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*, **173**, 1213-25.
- Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R. & Villadangos, J.A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev*, **199**, 9-26.

- Heemels, M.T. & Ploegh, H. (1995). Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem*, **64**, 463-91.
- Heit, A., Huster, K.M., Schmitz, F., Schiemann, M., Busch, D.H. & Wagner, H. (2004). CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J Immunol*, **172**, 1501-7.
- Held, G., Matsuo, M., Epel, M., Gnjjatic, S., Ritter, G., Lee, S.Y., Tai, T.Y., Cohen, C.J., Old, L.J., Pfreundschuh, M., Reiter, Y., Hoogenboom, H.R. & Renner, C. (2004). Dissecting cytotoxic T cell responses towards the NY-ESO-1 protein by peptide/MHC-specific antibody fragments. *Eur J Immunol*, **34**, 2919-29.
- Held, G., Wadle, A., Dauth, N., Stewart-Jones, G., Sturm, C., Thiel, M., Zwick, C., Dieckmann, D., Schuler, G., Hoogenboom, H.R., Levy, F., Cerundolo, V., Pfreundschuh, M. & Renner, C. (2007). MHC-peptide-specific antibodies reveal inefficient presentation of an HLA-A*0201-restricted, Melan-A-derived peptide after active intracellular processing. *Eur J Immunol*, **37**, 2008-17.
- Henderikx, P., Kandilogiannaki, M., Petrarca, C., von Mensdorff-Pouilly, S., Hilgers, J.H., Krambovitis, E., Arends, J.W. & Hoogenboom, H.R. (1998). Human single-chain Fv antibodies to MUC1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma. *Cancer Res*, **58**, 4324-32.
- Hendil, K.B. & Hartmann-Petersen, R. (2004). Proteasomes: a complex story. *Curr Protein Pept Sci*, **5**, 135-51.
- Hilt, W. & Wolf, D.H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci*, **21**, 96-102.
- Hoogenboom, H.R. & Chames, P. (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today*, **21**, 371-8.
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. & Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4133-7.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Principiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D. & Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, **425**, 402-6.
- Hoyer-Hansen, G., Hamers, M.J., Pedersen, A.N., Nielsen, H.J., Brunner, N., Dano, K. & Stephens, R.W. (2000). Loss of ELISA specificity due to biotinylation of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, **235**, 91-9.
- Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J. & Lerner, R.A. (1989). Generation of a large combinatorial li-

- brary of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, **246**, 1275-81.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., Crea, R. & et al. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5879-83.
- Hutter, H., Hammer, A., Blaschitz, A., Hartmann, M., Ebbesen, P., Dohr, G., Ziegler, A. & Uchanska-Ziegler, B. (1996). Expression of HLA class I molecules in human first trimester and term placenta trophoblast. *Cell Tissue Res*, **286**, 439-47.
- Ivanov, V.S., Suvorova, Z.K., Tchikin, L.D., Kozhich, A.T. & Ivanov, V.T. (1992). Effective method for synthetic peptide immobilization that increases the sensitivity and specificity of ELISA procedures. *J Immunol Methods*, **153**, 229-33.
- Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J. & Knuth, A. (1998). Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*, **187**, 265-70.
- Jager, E., Jager, D. & Knuth, A. (2002). Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol*, **14**, 178-82.
- Jager, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Oesch, F. & Knuth, A. (1997). Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer*, **71**, 142-7.
- Janeway, C.A., P. Travers, et al. (2002). *Immunologie*. Spektrum, Akad. Verl.
- Jardetzky, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R. & Wiley, D.C. (1991). Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*, **353**, 326-9.
- Johnsen, A.K., Templeton, D.J., Sy, M. & Harding, C.V. (1999). Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol*, **163**, 4224-31.
- Jones, P.A. & Laird, P.W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, **21**, 163-7.
- June, C.H. (2007). Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest*, **117**, 1466-76.

- Kadokura, H., Katzen, F. & Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, **72**, 111-35.
- Kageyama, S., Tsomides, T.J., Sykulev, Y. & Eisen, H.N. (1995). Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *J Immunol*, **154**, 567-76.
- Kalejs, M. & Erenpreisa, J. (2005). Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer Cell Int*, **5**, 4.
- Kawakami, K., Brabender, J., Lord, R.V., Groshen, S., Greenwald, B.D., Krasna, M.J., Yin, J., Fleisher, A.S., Abraham, J.M., Beer, D.G., Sidransky, D., Huss, H.T., Demeester, T.R., Eads, C., Laird, P.W., Ilson, D.H., Kelsen, D.P., Harpole, D., Moore, M.B., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V. & Meltzer, S.J. (2000). Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 1805-11.
- Kearse, K.P., Takahama, Y., Punt, J.A., Sharrow, S.O. & Singer, A. (1995). Early molecular events induced by T cell receptor (TCR) signaling in immature CD4+ CD8+ thymocytes: increased synthesis of TCR-alpha protein is an early response to TCR signaling that compensates for TCR-alpha instability, improves TCR assembly, and parallels other indicators of positive selection. *J Exp Med*, **181**, 193-202.
- Kim, J., Modlin, R.L., Moy, R.L., Dubinett, S.M., McHugh, T., Nickoloff, B.J. & Uye-mura, K. (1995). IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol*, **155**, 2240-7.
- Kim, Y.I., Giuliano, A., Hatch, K.D., Schneider, A., Nour, M.A., Dallal, G.E., Selhub, J. & Mason, J.B. (1994). Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*, **74**, 893-9.
- King, J. & Laemmli, U.K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol*, **62**, 465-77.
- Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A.L. & Gatter, K.C. (1996). Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer*, **73**, 148-53.
- Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I. & Brocker, T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J Immunol*, **166**, 1439-42.
- Kushner, S.R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. In *Genetic engineering*, Elsevier (ed) pp. 17-23: Amsterdam.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Larrick, J.W., Danielsson, L., Brenner, C.A., Abrahamson, M., Fry, K.E. & Borrebaeck, C.A. (1989). Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, **160**, 1250-6.
- Lederberg, E.M. & Cohen, S.N. (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, **119**, 1072-4.
- Lethe, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., De Plaen, E. & Boon, T. (1998). LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int J Cancer*, **76**, 903-8.
- Li, Y.S., Hayakawa, K. & Hardy, R.R. (1993). The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med*, **178**, 951-60.
- Lim, F.L., Soulez, M., Koczan, D., Thiesen, H.J. & Knight, J.C. (1998). A KRAB-related domain and a novel transcription repression domain in proteins encoded by SSX genes that are disrupted in human sarcomas. *Oncogene*, **17**, 2013-8.
- Lin, A.Y., Devaux, B., Green, A., Sagerstrom, C., Elliott, J.F. & Davis, M.M. (1990). Expression of T cell antigen receptor heterodimers in a lipid-linked form. *Science*, **249**, 677-9.
- Lin, C.H., Hsieh, S.Y., Sheen, I.S., Lee, W.C., Chen, T.C., Shyu, W.C. & Liaw, Y.F. (2001). Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*, **61**, 4238-43.
- Lopez, D. & Del Val, M. (1997). Selective involvement of proteasomes and cysteine proteases in MHC class I antigen presentation. *J Immunol*, **159**, 5769-72.
- Madden, D.R. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol*, **13**, 587-622.
- Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Clackson, T.P., Bye, J.M. & Winter, G. (1992a). By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (N Y)*, **10**, 779-83.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1992b). Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J Biol Chem*, **267**, 16007-10.

- Matko, J., Bushkin, Y., Wei, T. & Edidin, M. (1994). Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. *J Immunol*, **152**, 3353-60.
- Matlack, K.E., Mothes, W. & Rapoport, T.A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell*, **92**, 381-90.
- Matsumura, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A. & Wilson, I.A. (1992). Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*, **257**, 927-34.
- Mavrangelos, C., Swart, B., Nobbs, S., Nicholson, I.C., Macardle, P.J. & Zola, H. (2004). Detection of low-abundance membrane markers by immunofluorescence--a comparison of alternative high-sensitivity methods and reagents. *J Immunol Methods*, **289**, 169-78.
- McAdam, S.N., Fleckenstein, B., Rasmussen, I.B., Schmid, D.G., Sandlie, I., Bogen, B., Viner, N.J. & Sollid, L.M. (2001). T cell recognition of the dominant I-A(k)-restricted hen egg lysozyme epitope: critical role for asparagine deamidation. *J Exp Med*, **193**, 1239-46.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**, 552-4.
- Meuwissen, R.L., Meerts, I., Hoovers, J.M., Leschot, N.J. & Heyting, C. (1997). Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene. *Genomics*, **39**, 377-84.
- Miyazaki, J., Appella, E., Zhao, H., Forman, J. & Ozato, K. (1986). Expression and function of a nonglycosylated major histocompatibility class I antigen. *J Exp Med*, **163**, 856-71.
- Momburg, F., Roelse, J., Hammerling, G.J. & Neefjes, J.J. (1994). Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med*, **179**, 1613-23.
- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, **7**, 145-73.
- Murphy, D.B., Lo, D., Rath, S., Brinster, R.L., Flavell, R.A., Slanetz, A. & Janeway, C.A., Jr. (1989). A novel MHC class II epitope expressed in thymic medulla but not cortex. *Nature*, **338**, 765-8.
- Niedermann, G., King, G., Butz, S., Birsner, U., Grimm, R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. & Eichmann, K. (1996). The proteolytic fragments generated by vertebrate proteasomes: structural relationships to major histocompatibility complex class I binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8572-7.

- Nisonoff, A., Wissler, F.C., Lipman, L.N. & Woernley, D.L. (1960). Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. *Arch Biochem Biophys*, **89**, 230-44.
- Norbury, C.C., Basta, S., Donohue, K.B., Tschärke, D.C., Princiotta, M.F., Berglund, P., Gibbs, J., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. (2004). CD8⁺ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science*, **304**, 1318-21.
- Nunes, J., Klasen, S., Ragueneau, M., Pavon, C., Couez, D., Mawas, C., Bagnasco, M. & Olive, D. (1993). CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events. *Int Immunol*, **5**, 311-5.
- Old, L.J. (2001). Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun*, **1**, 1.
- O'Mahony, D. & Bishop, M.R. (2006). Monoclonal antibody therapy. *Front Biosci*, **11**, 1620-35.
- Orlandi, R., Gussow, D.H., Jones, P.T. & Winter, G. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 3833-7.
- Ortmann, B., Androlewicz, M.J. & Cresswell, P. (1994). MHC class I/β2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*, **368**, 864-7.
- Osmond, D.G., Rolink, A. & Melchers, F. (1998). Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today*, **19**, 65-8.
- Pamer, E. & Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*, **16**, 323-58.
- Papavasiliou, F.N. & Schatz, D.G. (2002). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*, **109 Suppl**, S35-44.
- Parham, P. & Brodsky, F.M. (1981). Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum Immunol*, **3**, 277-99.
- Parham, P. & Ohta, T. (1996). Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science*, **272**, 67-74.
- Parmigiani, R.B., Bettoni, F., Vibrationovski, M.D., Lopes, M.H., Martins, W.K., Cunha, I.W., Soares, F.A., Simpson, A.J., de Souza, S.J. & Camargo, A.A. (2006). Characterization of a cancer/testis (CT) antigen gene family capable of eliciting humoral response in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18066-71.

- Parmley, S.F. & Smith, G.P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, **73**, 305-18.
- Patel, K.J. & Neuberger, M.S. (1993). Antigen presentation by the B cell antigen receptor is driven by the alpha/beta sheath and occurs independently of its cytoplasmic tyrosines. *Cell*, **74**, 939-46.
- Piali, L., Fichtel, A., Terpe, H.J., Imhof, B.A. & Gisler, R.H. (1995). Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma. *J Exp Med*, **181**, 811-6.
- Pluckthun, A. & Skerra, A. (1989). Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, **178**, 497-515.
- Polson, A., Potgieter, G.M., Largier, J.F., Mears, G.E. & Joubert, F.J. (1964). The Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight. *Biochim Biophys Acta*, **82**, 463-75.
- Porath, J. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*, **3**, 263-81.
- Porter, R.R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J*, **73**, 119-26.
- Preuss, K.D., Zwick, C., Bormann, C., Neumann, F. & Pfreundschuh, M. (2002). Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev*, **188**, 43-50.
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S.B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, **18**, 343-54.
- Proba, K., Ge, L. & Pluckthun, A. (1995). Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB). *Gene*, **159**, 203-7.
- Purbhoo, M.A., Sutton, D.H., Brewer, J.E., Mullings, R.E., Hill, M.E., Mahon, T.M., Karbach, J., Jager, E., Cameron, B.J., Lissin, N., Vyas, P., Chen, J.L., Cerundolo, V. & Jakobsen, B.K. (2006). Quantifying and imaging NY-ESO-1/LAGE-1-derived epitopes on tumor cells using high affinity T cell receptors. *J Immunol*, **176**, 7308-16.
- Radoja, S. & Frey, A.B. (2000). Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing. *Mol Med*, **6**, 465-79.

- Ramal, L.M., Maleno, I., Cabrera, T., Collado, A., Ferron, A., Lopez-Nevot, M.A. & Garrido, F. (2000). Molecular strategies to define HLA haplotype loss in micro-dissected tumor cells. *Hum Immunol*, **61**, 1001-12.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A. & Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, **50**, 213-9.
- Rammensee, H.G., Friede, T. & Stevanović, S. (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, **41**, 178-228.
- Rayman, P., Uzzo, R.G., Kolenko, V., Bloom, T., Cathcart, M.K., Molto, L., Novick, A.C., Bukowski, R.M., Hamilton, T. & Finke, J.H. (2000). Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 receptor signaling: a mechanism of immune escape. *Cancer J Sci Am*, **6 Suppl 1**, S81-7.
- Reiter, Y., Di Carlo, A., Fugger, L., Engberg, J. & Pastan, I. (1997). Peptide-specific killing of antigen-presenting cells by a recombinant antibody-toxin fusion protein targeted to major histocompatibility complex/peptide class I complexes with T cell receptor-like specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4631-6.
- Restifo, N.P. (2000). Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med*, **6**, 493-5.
- Reth, M. (1992). Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **10**, 97-121.
- Romisch, K. (1999). Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci*, **112 (Pt 23)**, 4185-91.
- Ronchetti, A., Iezzi, G., Crosti, M.C., Garancini, M.P., Protti, M.P. & Bellone, M. (1999). Role of antigen-presenting cells in cross-priming of cytotoxic T lymphocytes by apoptotic cells. *J Leukoc Biol*, **66**, 247-51.
- Rotzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H.G. (1992). Peptide motifs of closely related HLA class I molecules encompass substantial differences. *Eur J Immunol*, **22**, 2453-6.
- Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A. & Dwek, R.A. (2001). Glycosylation and the immune system. *Science*, **291**, 2370-6.
- Rudolph, M.G., Stanfield, R.L. & Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*, **24**, 419-66.
- Sahin, U., Tureci, O. & Pfreundschuh, M. (1997). Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, **9**, 709-16.

- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. & Pfreundschuh, M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11810-3.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: New York.
- Scanlan, M.J., Altorki, N.K., Gure, A.O., Williamson, B., Jungbluth, A., Chen, Y.T. & Old, L.J. (2000). Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett*, **150**, 155-64.
- Schatz, P.J. (1993). Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1138-43.
- Schoenberger, S.P., van der Voort, E.I., Krietemeijer, G.M., Offringa, R., Melief, C.J. & Toes, R.E. (1998). Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells. *J Immunol*, **161**, 3808-12.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F. & Ohashi, P.S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol*, **17**, 829-74.
- Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., Desoutter, J.F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P.M., Reiss, Y. & Hosmalin, A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol*, **4**, 375-9.
- Seliger, B., Maeurer, M.J. & Ferrone, S. (1997). TAP off--tumors on. *Immunol Today*, **18**, 292-9.
- Serrano, A., Tanzarella, S., Lionello, I., Mendez, R., Traversari, C., Ruiz-Cabello, F. & Garrido, F. (2001). Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer*, **94**, 243-51.
- Sgaramella, V., Van de Sande, J.H. & Khorana, H.G. (1970). Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **67**, 1468-75.

- Shapiro, A.L., Vinuela, E. & Maizel, J.V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, **28**, 815-20.
- Shenoy, B.C. & Wood, H.G. (1988). Purification and properties of the synthetase catalyzing the biotination of the aposubunit of transcarboxylase from *Propionibacterium shermanii*. *Faseb J*, **2**, 2396-401.
- Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T. & Old, L.J. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 615-25.
- Skerra, A. & Pluckthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, **240**, 1038-41.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315-7.
- Srivastava, P. (2002). Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol*, **20**, 395-425.
- Starr, T.K., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*, **21**, 139-76.
- Stenner-Liewen, F., Luo, G., Sahin, U., Tureci, O., Koslovski, M., Kautz, I., Liewen, H. & Pfreundschuh, M. (2000). Definition of tumor-associated antigens in hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 285-90.
- Sugimoto, M., Tahara, H., Ide, T. & Furuichi, Y. (2004). Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*, **64**, 3361-4.
- Todorovska, A., Roovers, R.C., Dolezal, O., Kortt, A.A., Hoogenboom, H.R. & Hudson, P.J. (2001). Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods*, **248**, 47-66.
- Toes, R.E., Nussbaum, A.K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N.P., Kraft, M., Laplace, C., Zwinderman, A., Dick, T.P., Muller, J., Schonfisch, B., Schmid, C., Fehling, H.J., Stevanovic, S., Rammensee, H.G. & Schild, H. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med*, **194**, 1-12.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 575-81.
- Tonegawa, S. (1988). Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep*, **8**, 3-26.
- Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N. & Pirrotta, V. (1978). Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **42 Pt 2**, 921-31.

- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4.
- Tureci, O., Chen, Y.T., Sahin, U., Gure, A.O., Zwick, C., Villena, C., Tsang, S., Seitz, G., Old, L.J. & Pfreundschuh, M. (1998). Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer*, **77**, 19-23.
- Tureci, O., Sahin, U. & Pfreundschuh, M. (1997). Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today*, **3**, 342-9.
- Tureci, O., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Scmitt, H., Schild, H.J., Stenner, F., Seitz, G., Rammensee, H.G. & Pfreundschuh, M. (1996). The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res*, **56**, 4766-72.
- Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S. & Boon, T. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med*, **182**, 689-98.
- Van den Eynde, B.J. & Boon, T. (1997a). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res*, **27**, 81-6.
- Van Den Eynde, B.J., Gaugler, B., Probst-Keppler, M., Michaux, L., Devuyst, O., Lorge, F., Weynants, P. & Boon, T. (1999). A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J Exp Med*, **190**, 1793-800.
- Van den Eynde, B.J. & van der Bruggen, P. (1997b). T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, **9**, 684-93.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. & Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, **254**, 1643-7.
- van der Merwe, P.A. & Davis, S.J. (2003). Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol*, **21**, 659-84.
- van Dijk, M.A. & van de Winkel, J.G. (2001). Human antibodies as next generation therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 368-74.
- van Endert, P.M. (1996). Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing? *Immunol Res*, **15**, 265-79.
- Van Pel, A., van der Bruggen, P., Coulie, P.G., Brichard, V.G., Lethe, B., van den Eynde, B., Uyttenhove, C., Renauld, J.C. & Boon, T. (1995). Genes coding for

- tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev*, **145**, 229-50.
- Virmani, A.K., Rathi, A., Sathyanarayana, U.G., Padar, A., Huang, C.X., Cunningham, H.T., Farinas, A.J., Milchgrub, S., Euhus, D.M., Gilcrease, M., Herman, J., Minna, J.D. & Gazdar, A.F. (2001). Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res*, **7**, 1998-2004.
- von Boehmer, H. & Fehling, H.J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol*, **15**, 433-52.
- von Boehmer, H. & Kisielow, P. (1990). Self-nonself discrimination by T cells. *Science*, **248**, 1369-73.
- Wadle, A., Held, G., Neumann, F., Kleber, S., Wuellner, B., Asemissen, A.M., Kubuschok, B., Scheibenbogen, C., Breinig, T., Meyerhans, A. & Renner, C. (2006). Cross-presentation of HLA class I epitopes from influenza matrix protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Vaccine*, **24**, 6272-81.
- Wagner, C., Neumann, F., Kubuschok, B., Regitz, E., Mischo, A., Stevanovic, S., Friedrich, M., Schmidt, W., Rammensee, H.G. & Pfreundschuh, M. (2003). Identification of an HLA-A*02 restricted immunogenic peptide derived from the cancer testis antigen HOM-MEL-40/SSX2. *Cancer Immun*, **3**, 18.
- Wagner, S.D. & Neuberger, M.S. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol*, **14**, 441-57.
- Walker, L.S. & Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*, **2**, 11-9.
- Ward, E.S., Gussow, D., Griffiths, A.D., Jones, P.T. & Winter, G. (1989). Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, **341**, 544-6.
- Wearsch, P.A., Jakob, C.A., Vallin, A., Dwek, R.A., Rudd, P.M. & Cresswell, P. (2004). Major histocompatibility complex class I molecules expressed with monoglucosylated N-linked glycans bind calreticulin independently of their assembly status. *J Biol Chem*, **279**, 25112-21.
- Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R. & Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, **25**, 821-52.
- Whitlow, M., D. Filpula. (1991). Single-Chain Fv Proteins and their fusion proteins. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, **2**, 97-105.

- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. & Ploegh, H.L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, **384**, 432-8.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. & Hoogenboom, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*, **12**, 433-55.
- Wolkers, M.C., Brouwenstijn, N., Bakker, A.H., Toebes, M. & Schumacher, T.N. (2004). Antigen bias in T cell cross-priming. *Science*, **304**, 1314-7.
- Yewdell, J.W. & Bennink, J.R. (1992). Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv Immunol*, **52**, 1-123.
- Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, **248**, 701-2.
- Zola, H. (2004). High-sensitivity immunofluorescence/flow cytometry: detection of cytokine receptors and other low-abundance membrane molecules. *Curr Protoc Cytom*, **Chapter 6**, Unit 6 3.

4. Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht in:

Gerhard Held*, Frank Neumann*, Christine Sturm*, Lars Kaestner, Nina Dauth, Diederik R. de Bruijn, Christoph Renner, Peter Lipp and Michael Pfreundschuh (2008). "Differential presentation of tumor antigen-derived epitopes by MHC-class I and antigen-positive tumor cells." Int J Cancer 123(8): 1841-7.

Frank Neumann*, Christine Sturm*, Martin Hülsmeier, Nina Dauth, Philippe Guillaume, Immanuel F. Luescher, Michael Pfreundschuh and Gerhard Held. "Fab antibodies capable of blocking T cells by competitive binding have the identical specificity but a higher affinity to the MHC-peptide-complex than the T cell receptor." Immunol Lett, **125**, 86-92.

Weitere Publikationen:

Gerhard Held *, Andreas Wadle *, Nina Dauth *, Guillaume Stewart-Jones, Christine Sturm, Markus Thiel, Carsten Zwick, Detlef Dieckmann, Gerold Schuler, Hennie R Hoogenboom, Frederic Levy, Vincenzo Cerundolo, Michael Pfreundschuh and Christoph Renner (2007). "MHC-peptide Specific Antibodies Reveal Inefficient Presentation of an HLA-A*0201-restricted, Melan-A Derived Peptide after Active Intracellular Processing." Eur J Immunol **37**(7): 2008-17

Nina Dauth, Jan Voswinkel, Christine Sturm, Andreas Wadle, Guillaume Stewart-Jones, Hennie R Hoogenboom, Vincenzo Cerundolo, Christoph Renner, Michael Pfreundschuh and Gerhard Held: "Increasing peptide binding to HLA-A*0201 by A/L substitution at p2 of Melan-A26-35 provides higher affinity interaction of TCR-like molecules." Zur Veröffentlichung anstehend.

*contributed equally to this work

5. Danksagung

Mein Dank gilt als erstes Herrn Prof. Dr. Michael Pfreundschuh für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit im onkologischen Labor der Inneren Medizin I zu erstellen und für das Angebot, meine Arbeit im Rahmen einer hilfswissenschaftliche Tätigkeit zu erweitern. Sein immer reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit waren Motivation und Herausforderung zugleich.

Herrn Prof. Dr. Christoph Renner danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Arbeit sowie für die stete Betreuung und Bereitschaft zur Diskussion bis zu seinem Weggang.

Herrn Dr. Gerhard Held möchte ich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, die Einführung in das Thema und in die experimentellen Verfahrensweisen, die stete Bereitschaft zur Diskussion sowie die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Frau Nina Dauth danke ich für die schon zuvor bestehende intensive Freundschaft und eine sehr schöne Zeit, in der wir gemeinsam durch Höhen und Tiefen gegangen sind.

Ein besonderer Dank gilt dem Leiter des Instituts für Molekulare Zellbiologie, Herrn Prof. Dr. P. Lipp, für das zur Verfügung gestellte inverse Mikroskop und Herrn Dr. rer. nat. Lars Kästner für die Einführung in das Mikroskop und die Software sowie die konstruktive und interessante Kooperation.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. habil. R. Bernhardt des Instituts für Biochemie der Universität des Saarlandes danke ich für die Möglichkeit der Oberflächenplasmonresonanzmessungen im Rahmen meiner Arbeit.

Herrn Dr. Carsten Zwick schulde ich besonderen Dank für die Durchführung der Selektionen sowie die Überlassung der daraus resultierenden Antikörper gegen SSX2₄₁₋₄₉.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Frank Neumann für so manchen wissenschaftlichen Rat, die Einführung in die Arbeit mit T-Zellen und die Hilfestellung bei der Planung und Durchführung diverser Elispots. Frau Dr. Claudia Wagner bin ich sehr dankbar für die Bereitstellung der von ihr generierten SSX2₁₀₃₋₁₁₁-spezifischer T-Zell-Klone, welche die Inhibitionsversuche im Rahmen meiner Doktorarbeit erst ermöglicht haben.

Bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Onkologischen Labors der Inneren Medizin I möchte ich mich für eine gute Zusammenarbeit sowie ein sehr gutes Arbeitsklima bedanken. Bei Fragen oder Problemen fand sich zu jedem Zeitpunkt ein offenes Ohr.

Insbesondere Frau Gabi Carbon danke ich für die sehr gute Unterstützung und konstruktive Kritik im Rahmen meiner Arbeit

Die für mich sehr wertvolle Hilfe bei sämtlichen computertechnischen Problemen kam von Herrn Marek Guzicki, der mir auch bei der Formatierung der vorliegenden Arbeit behilflich war. Für diese Bereitschaft und die entstandene Freundschaft bedanke ich mich herzlich.

Zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung danken auch dafür, dass sie immer fest an mich geglaubt haben, und mir mit menschlichem Rat und vor allem Rückhalt zur Seite standen.